

**Interaktionen zwischen löslichen Komponenten
des flagellenspezifischen Typ III-Sekretionssystems
von *Escherichia coli* K12**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Petra Pöplau

eingereicht am
12.07.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2007

Erster Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schüler

INHALT

	SEITE
ABKÜRZUNGEN	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 BIOGENESE DES BAKTERIELLEN FLAGELLUMS	9
1.2 EIGENSCHAFTEN DER KOMPONENTEN DES FLAGELLÄREN EXPORTAPPARATES	12
1.3 SUBSTRATE UND CHAPERONE DER FLAGELLÄREN TYP III-SEKRETION	15
1.4 TYP III-SEKRETIONSSYSTEME IM VERGLEICH	16
1.5 EXPORTSIGNALS DER TYP III-SEKRETION	17
1.6 ZIEL DER ARBEIT	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 MATERIAL	21
2.1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> -STÄMME UND PLASMIDE	21
2.1.2 PRIMER	21
2.2 KULTIVIERUNG UND ZELLAUFSCHLUSS VON <i>E. COLI</i>	23
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.3.1 POLYMERASEKETTENREAKTION	25
2.3.2 RESTRIKTIONSVERDAU	26
2.3.3 REINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN	27
2.3.4 AGAROSEGELELEKTROPHORESE	28
2.3.5 LIGATION	28
2.3.6 TRANSFORMATION	28
2.3.7 PLASMIDPRÄPARATION	29
2.4 GERICHTETE DELETIONSMUTAGENESE	29
2.5 SEQUENZIERUNG	31
2.6 BIOCHEMISCHE METHODEN	31
2.6.1 PROTEINREINIGUNG	31
2.6.2 POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	34
2.6.3 FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN	35
2.6.4 WESTERNBLOT	36
2.7 MESSUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN	37
2.7.1 ATPASE-AKTIVITÄT	38
2.7.2 AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE	38

2.7.3 AKTIVITÄT DER ISOCITRATDEHYDROGENASE	39
2.8 PLATTENTESTS	40
2.8.1 MOTILITÄT VON <i>E. COLI</i>	40
2.8.2 BLAU/WEISS-SELEKTION	41
2.9 PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN	41
2.9.1 CO-REINIGUNG	41
2.9.2 AFFINITÄTSBLOT	42
2.9.3 SURFACE PLASMON RESONANCE	42
2.9.4 ISOTHERMALE TITRATIONS-KALORIMETRIE	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1 GEWINNUNG VON FTTSS-SPEZIFISCHEN <i>E. COLI</i> -DELETIONSMUTANTEN	45
3.2 KLONIERUNG VON GENEN DES FTTSS	48
3.3 GENEXPRESSION VON <i>FLGD</i> , <i>FLGE</i> , <i>FLIC</i> , <i>FLIH</i> , <i>FLII</i> UND <i>FLIJ</i>	50
3.4 MOTILITÄT VON KOMPLEMENTIERTEN DELETIONSMUTANTEN	53
3.5 INTERAKTIONEN ZWISCHEN FLIH, FLII, FLIJ UND SUBSTRATEN	57
3.5.1 CO-REINIGUNG VON FLIH, FLII UND FLIJ UND SUBSTRATEN	57
3.5.2 REINIGUNG VON FLIH, FLII UND FLIJ	60
3.5.3 OLIGOMERISIERUNG VON FLIH BZW. FLII	62
3.5.4 ATPASE-AKTIVITÄT VON FLII	64
3.5.5 INTERAKTIONSANALYSE DURCH AFFINITÄTSBLOT	64
3.5.6 INTERAKTIONSANALYSE MITTELS ISOTHERMALER TITRATIONS-KALORIMETRIE	65
3.5.7 INTERAKTIONSANALYSE MITTELS SURFACE PLASMON RESONANCE	67
3.6 CHARAKTERISIERUNG DES TYP III-EXPORTSIGNALS	71
3.6.1 FUNKTIONSWEISE DES EXPORTS DER FLGD _{PHOA} -HYBRIDPROTEINE INS PERIPLASMA	72
3.6.2 AUSWIRKUNGEN VON <i>FLGD</i> -VERKÜRZUNGEN AUF DEN FLGD _{PHOA} -EXPORT	75
3.6.3 EINFLUSS VON VERÄNDERUNGEN DER NUKLEOTID- UND AMINOSÄURESEQUENZ VON FLGD AUF DEN FLGD _{PHOA} -EXPORT	77
3.6.4 BEDEUTUNG DER AMINOSÄURE 52 FÜR DEN EXPORT VON FLGD _{PHOA}	79
3.6.5 AUSWIRKUNGEN VON C-TERMINALEN FLGE-VERKÜRZUNGEN AUF DEN EXPORT VON FLGE _{PHOA}	82

4. DISKUSSION	84
4.1 KOMPLEMENTATION VON DELETIONSMUTANTEN DURCH REKOMBINANTE PROTEINE	84
4.2 FLIH, FLII UND FLIJ BILDEN EINEN HETEROOLIGOMEREN KOMPLEX	85
4.3 INDIVIDUELLE REINIGUNG VON FLIH, FLII UND FLIJ	88
4.4 OLIGOMERISIERUNG VON FLIH BZW. FLII <i>IN VITRO</i>	89
4.5 STIMULATION DER ATPASE-AKTIVITÄT VON FLII DURCH OLIGOMERISIERUNG	90
4.6 AFFINITÄTEN ZWISCHEN FLIH, FLII UND FLIJ	91
4.7 DIE N-TERMINALEN 71 AMINOSÄUREN SIND FÜR DEN EXPORT DES SUBSTRATS FLGD ESSENTIELL	93
4.8 DAS EXPORTSIGNAL VON FLGD HAT PROTEINCHARAKTER	95
5. ZUSAMMENFASSUNG	99
6. LITERATUR	101
7. ANHANG	113
7.1 ANHANG ZUR EINLEITUNG	113
7.2 ANHANG ZU MATERIAL UND METHODEN	116
7.3 ANHANG ZU DEN ERGEBNISSEN	119
DANKSAGUNG	127
VERÖFFENTLICHUNG	127
EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	127
ERKLÄRUNGEN	127
LEBENS LAUF	128

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
as	antisense
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
CIP	calf intestine phosphatase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
ECL	enhanced chemiluminescence
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRT	flipase recombination target
fTTSS	flagelläres Typ III-Sekretionssystem
HABA	2-[(4-Hydroxyphenyl)azo]benzoesäure
HBS	HEPES-buffered saline
HBS-EP	HBS-EDTA-P20
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IP TG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid

ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Kan ^R	Kanamycinresistenz
KP _i	Kaliumphosphat
LB	lysogeny broth
MCS	multiple cloning site
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethansulfonfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RU	resonance unit
s	sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS-Tween 20
TBS-TT	TBS-Tween 20-Triton X 100
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TN	Tris-Natrium
TTSS	Typ III-Sekretionssystem

1. EINLEITUNG

Das bakterielle Flagellum ist Struktur zur Fortbewegung und Proteinexportapparat in einem. Es besteht aus Basalkörper, Haken und Filament und reicht vom Cytoplasma bis in die Umgebung der Bakterienzelle. Durch Flagellen sind Bakterien beweglich (Abbildung 1.1). Diese Beweglichkeit hilft ihnen, günstige Umweltbedingungen zu erreichen, schlechte zu meiden, Wirtsorganismen oder Zielorgane zu kolonisieren, sich an Substrate zu heften oder Biofilme zu bilden. Dafür sind Signalverbindungen der bakteriellen Sensorproteine über die Chemotaxisproteine mit dem Flagellum notwendig.

Während der Biogenese des bakteriellen Flagellums (Kapitel 1.1) müssen die externen Untereinheiten an ihren Bestimmungsort transportiert werden. Dies geschieht, wie bei allen Gram-negativen Bakterien, auch in *Escherichia coli* mit Hilfe des flagellären Typ III-Sekretionssystems (fTTSS). Neben Typ III-Sekretionssystemen (TTSS) nutzen Gram-negative Bakterien weitere Sekretionssysteme für den Transport von Proteinen über die innere und äußere Membran. Der Prototyp des Typ I-Exports ist die α -Hämolysin-Sekretion durch *E. coli*. Das Typ II-Sekretionssystem ist vom sogenannten Sec-System, welches Proteine zunächst bis ins Periplasma transportiert, abhängig und wird zum Beispiel von *Klebsiella oxytoca* für die Pullulanase-Sekretion genutzt. *Agrobacterium tumefaciens* transloziert mit Hilfe der Typ IV-Sekretion onkogene DNA in Pflanzenzellen (Thanassi und Hultgren, 2000). Durch das fTTSS werden die Proteine in einem Schritt vom Cytoplasma an ihren Bestimmungsort exportiert. Damit ist auch das fTTSS ein Sec-unabhängiges Sekretionssystem.

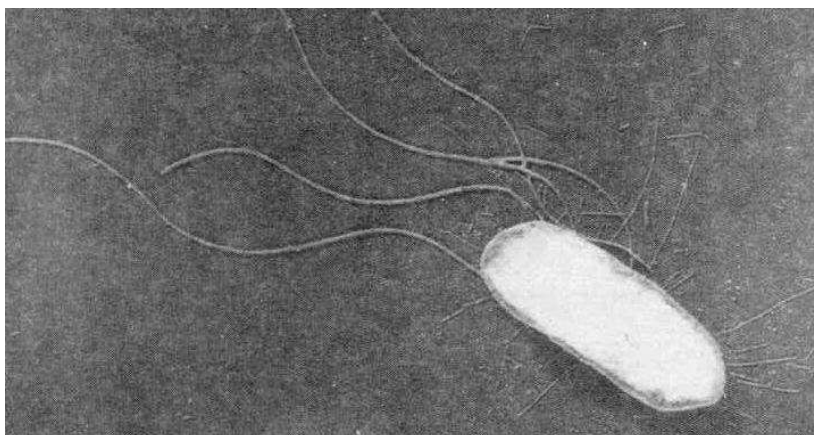


ABBILDUNG 1.1:
Flagellierung von
***E. coli*.**

Durch Antrieb der peritrich angeordneten Flagellen ist die Bakterienzelle beweglich. Die Höhe der Abbildung entspricht 3,5 μm (aus Berg, 1975).

1.1 BIOGENESE DES BAKTERIELLEN FLAGELLUMS

Die Flagellenbiogenese ist streng hierarchisch organisiert. Diese Hierarchie führt bei lateralen Flagellen das Masteroperon *flhDC* an. Diese Klasse 1-Gene erfahren ihrerseits eine multiple Regulation durch Wachstumsphase, Temperatur, Osmolarität und weitere Umweltfaktoren über regulatorische Proteine. Der heterotetramere Mastertranskriptionsregulator FlhD₂FlhC₂ ist dann Aktivator der frühen Klasse 2-Gene. Unter diesen Klasse 2-Genen befindet sich *fliA*. FliA ist ein flagellenspezifischer σ^{28} -Faktor und der Aktivator der späten Klasse 3-Gene, der durch den Anti- σ -Faktor FlgM gehemmt wird (Kalir *et al.*, 2001; Soutourina und Bertin, 2003; Stafford *et al.*, 2005). Tabelle 7.1.1 im Anhang listet auf, welche für Flagellenproteine kodierenden Gene den jeweiligen Gen-Klassen zugeordnet werden.

Beim Aufbau des bakteriellen Flagellums (Abbildung 1.2) wird als erstes der MS-Ring (FliF) in die Cytoplasmamembran integriert. Danach folgen Exportapparat (FlhA und B sowie FliO, P, Q, R, H, I und J), C-Ring (FliM und N), der Schaltkomplex des Motors (FliG) sowie die Motorproteine MotA und MotB. Für die Integration der Proteine in die Cytoplasmamembran ist vermutlich das Sec-System verantwortlich. Erst dann werden mit Hilfe des Exportapparates (Kapitel 1.2) des fTTSS der proximale Stab (FlgB, C und F) mit der Stabkappe FlgJ, die Muramidaseaktivität aufweist (Hirano *et al.*, 2001; Nambu *et al.*, 1999), das Basalkörperprotein FliE, welches die Verbindung zwischen Stab und MS-Ring herstellt (Minamino *et al.*, 2000b), und der distale Stab (FlgG) assembliert. Die Integration von P- (FlgI) und L-Ring (Lipoprotein FlgH), zur Vervollständigung des Basalkörpers, erfolgt wieder auf dem Sec-vermittelten Weg.

Haken (FlgD und E), das Protein FliK für den Substratspezifitätswechsel, die erste Haken-Filamentverbindung (FlgK), die zweite Haken-Filamentverbindung (FlgL), die Filamentkappe (FliD) und das Filament (FliC) selbst werden dann wieder mit Hilfe des fTTSS assembliert (Dailey und Macnab, 2002; Hirano *et al.*, 2003; Kubori *et al.*, 1997; Macnab, 1996; Macnab, 2003; Macnab, 2004; Saijo-Hamano *et al.*, 2004b). Der flagelläre Exportapparat befindet sich in der Pore innerhalb des MS-Rings, denn einzelne Komponenten von MS-Ring, C-Ring und Exportapparat interagieren miteinander (Fan *et al.*, 1997; González-Pedrajo *et al.*, 2006; Kihara *et al.*, 2000; Kihara *et al.*, 2001). Alle Komponenten des bakteriellen Flagellums sowie deren Anzahl an Aminosäuren, Molekulargewicht, Wert des isoelektrischen Punktes, Funktion und Lokalisation sind in Tabelle 7.1.2 im Anhang zusammengestellt.

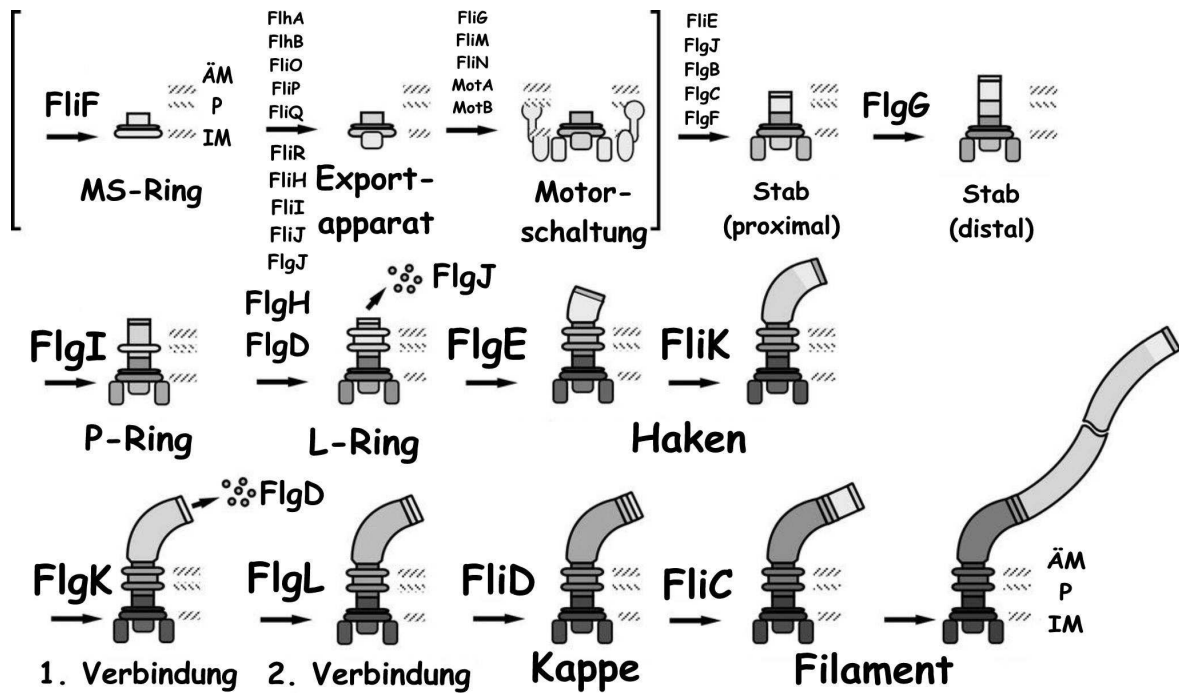


ABBILDUNG 1.2:
Morphogenese des bakteriellen Flagellums.

Die in eckigen Klammern dargestellten Komponenten werden vor der Typ III-Sekretion assembliert. Der Aufbau des Stabs unterliegt dann der Funktion des flagellären Export-apparates. P- und L-Ring werden zwischendurch mit Hilfe des Sec-abhängigen Systems integriert. Für Haken und Filament ist wieder das fTTSS zuständig (verändert aus Macnab, 2003; ÄM = Äußere Membran, P = Peptidoglykanschicht, IM = Innere Membran).

Das vollständig assemblierte, bakterielle Flagellum ist eine Art Propeller (Abbildung 1.3). Durch dessen Rotation kann sich das Bakterium fortbewegen. Die Energie für den Antrieb des Motors liefert die protonenmotorische Kraft. Der Motor besteht aus Stator und Rotor. Der Stator setzt sich aus den Proteinen MotA und MotB zusammen, wobei MotA für die Stabilität und die Erzeugung des Drehmoments und MotB für die Protonentranslokation zuständig ist. Die durch die protonenmotorische Kraft entstandenen Konformationsänderungen und Kräfte der Statorproteine gehen dann auf das Rotorprotein FliG, welches an den MS-Ring angelagert ist, über und werden schließlich an den Haken und das Filament weitergeleitet (Blair, 2003; Macnab, 1999; Muramoto und Macnab, 1998).

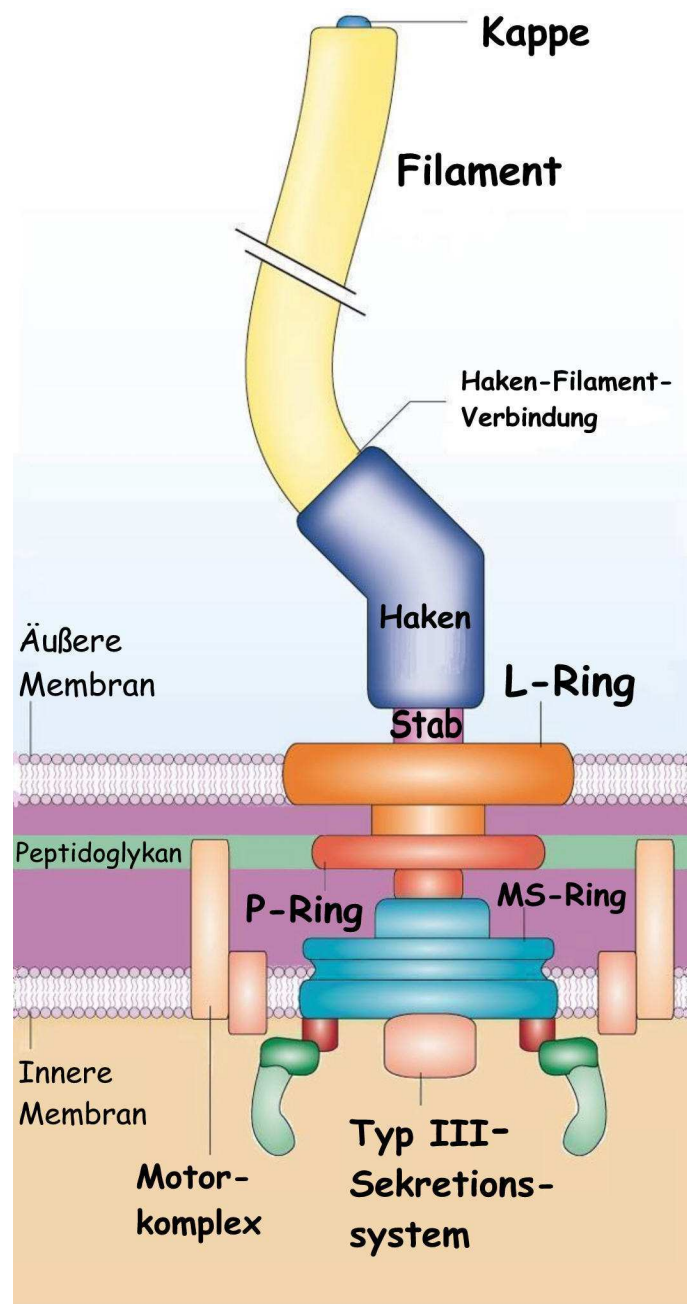
Die Rotation des Flagellums und damit auch die Motilität unterliegen der Kontrolle von Signalen aus der Umwelt über die Chemosensierung. Die Proteine des C-Rings, FliM und FliN, sind das Ziel von phosphoryliertem CheY (CheY-P) und damit der sensorischen Transduktionskette. Durch die Anbindung von CheY-P kommt es zu konformationellen

Änderungen zumindest von FliM. Diese Änderungen werden an FliG und schließlich auch an das Filament weiter gegeben, die Protofilamente nehmen dabei eine nach rechts gerichtete helikale Struktur ein, und damit eine Rotation des Flagellums im Uhrzeigersinn und ein Taumeln des Bakteriums induziert. Ist die helikale Struktur der Protofilamente aus FliC nach links gerichtet, rotiert der Propeller gegen den Uhrzeigersinn und das Bakterium schwimmt (Macnab 2003; Manson *et al.*, 1998; Minamino und Namba, 2004; Samatey *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2006; Toker *et al.*, 1996; Toker und Macnab, 1997).

ABBILDUNG 1.3:
Schematische Darstellung des bakteriellen Flagellums und Lage des flagellenspezifischen Typ III-Sekretionssystems.

Das bakterielle Flagellum besteht aus dem Basalkörper, der in den Membranen über MS- und L-Ring und in der Peptidoglykanschicht über den P-Ring verankert ist. An den Stab des Basalkörpers schließen die beiden externen Strukturen Haken und Filament mit Kappe an.

Die Komponenten des flagellenspezifischen Typ III-Sekretionssystems liegen in der Pore des MS-Rings. Der Motorkomplex ist für die Rotation des Flagellums verantwortlich (verändert aus Pallen und Matzke, 2006).



1.2 EIGENSCHAFTEN DER KOMPONENTEN DES FLAGELLÄREN EXPORTAPPARATES

Eine vollständige Assemblierung des Flagellums kann nicht ohne den Exportapparat erfolgen. Der flagelläre Exportapparat ist in der Pore des MS-Rings lokalisiert (Abbildung 1.4). Er besteht sowohl aus den sechs membranständigen Komponenten FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ und FliR als auch aus den drei cytosolischen Proteinen FliH, FliI und FliJ, die an die Membran assoziieren (Evans *et al.*, 2006; Minamino und Macnab, 1999). Substrate für den Exportapparat sind die Komponenten des Stabs, eine der Strukturen des Basalkörpers, des Hakens und des Filaments. Diese müssen durch den Kanal innerhalb der wachsenden Struktur des Flagellums zum distalen Ende transportiert werden.

Die Komponenten des flagellären Exportapparates, die in der Cytoplasmamembran gelegen sind, wurden aufgrund ihrer hydrophoben Bereiche als Membranproteine identifiziert (Minamino *et al.*, 1994; Ohnishi *et al.*, 1997; Schoenhals *et al.*, 1998) und werden mit Hilfe des Sec-Systems in die innere Membran eingebaut (Pradel *et al.*, 2005). Interaktionen wurden für einzelne dieser Komponenten untereinander und mit dem MS-Ring in *Salmonella typhimurium* gezeigt (McMurry *et al.*, 2004; Van Arnam *et al.*, 2004).

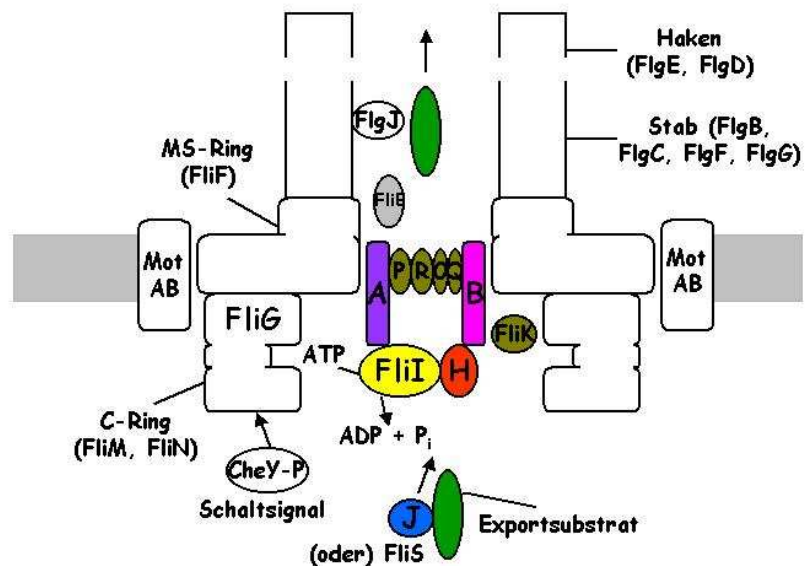
FlhA und FlhB interagieren auch miteinander (Zhu *et al.*, 2002) und haben zudem Bereiche, die ins Cytoplasma reichen (Minamino und Macnab, 1999). In einigen Bakterien, jedoch nicht in *E. coli* und *S. typhimurium*, ist das Protein FlhX vorhanden. Dieses ähnelt der cytoplasmatischen Domäne von FlhB (Pallen *et al.*, 2005). Der cytoplasmatische Bereich von FlhB ist, zusammen mit FliK, bei der Regulation der Substratspezifität von Bedeutung (Minamino *et al.*, 2004). FlhB durchläuft einen autokatalytischen Prozess und spaltet etwa die Hälfte der eigenen C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne ab. Diese Abspaltung bewirkt einen Wechsel der Substraterkennung von Stab- oder Hakenproteinen zu Proteinen des Filamenttyps während der flagellären Morphogenese (Ferris *et al.*, 2005; Fraser *et al.*, 2003b; Minamino und Macnab, 2000b). Die cytoplasmatischen Teile von FlhB und FlhA stellen die Verbindung zu den cytoplasmatischen Komponenten des Exportapparates, FliH, FliI und FliJ, her, die ihrerseits mit den zu transportierenden Proteinen interagieren (Minamino und Macnab, 1999; Minamino und Macnab, 2000a; Saijo-Hamano *et al.*, 2004a; Zhu *et al.*, 2002).

FliI ist die ATPase im zunächst cytoplasmatischen Komplex und liefert die Energie für den Proteinexport durch die Hydrolyse von ATP. Es ist eine signifikante Sequenzähnlichkeit (ca. 30 % Identität) von FliI zu den β -Untereinheiten der F_0F_1 -ATPasen vorhanden (Dreyfus *et al.*, 1993; Fan und Macnab, 1996; Imada *et al.*, 2007; Vogler *et al.*,

1991). Die Walker A- und B-Motive für die ATP-Bindestelle sind in FliI stark konserviert (Vogler *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1982). Auch strukturell ähnelt FliI den α - und β -Untereinheiten der F_0F_1 -ATPasen (Imada *et al.*, 2007; Minamino *et al.*, 2006a). Die ATPase-Domäne von FliI liegt im C-terminalen Bereich (Fan und Macnab, 1996), der N-terminale Bereich von FliI interagiert mit FliH. Letztere Interaktion beeinflusst die ATPase-Funktion von FliI (Minamino *et al.*, 2001; Minamino und Macnab, 2000c). FliI interagiert zudem mit der Cytoplasmamembran (Auvray *et al.*, 2002) und den Substraten FlgE und FliC (Silva-Herzog und Dreyfus, 1999). Unter dem Einfluss von ATP erfolgt eine Oligomerisierung von FliI zu einer hexameren Ringstruktur über die Bindung der N-terminalen Regionen der sechs Monomere (Claret *et al.*, 2003; Minamino *et al.*, 2006b). Dieses Homohexamer ist jedoch nicht so stabil wie das Heterohexamer bestehend aus den α - und β -Untereinheiten der F_0F_1 -ATPasen (Imada *et al.*, 2007).

ABBILDUNG 1.4:
Lage des flagellären Exportapparates.

Die Komponenten FlhA (A), FliP (P), FliR (R), FliO (O), FliQ (Q) und FlhB (B) befinden sich im MS-Ring und sind in der Cytoplasmamembran verankert. Die cytosolischen Komponenten FliI, FliH und FliJ können mit der Membran assoziiert sein (verändert aus Minamino und Macnab, 1999).



FliH reguliert FliI und hält es vermutlich in einem monomeren Zustand (Imada *et al.*, 2007). Die ATPase-Aktivität von FliI wird durch FliH gehemmt. Es bildet sich ein $FliH_2FliI$ -Heterotrimer, welches auch mit der Membran interagieren kann (Auvray *et al.*, 2002; Minamino und Macnab, 2000a). Die C-terminale Domäne von FliH interagiert dabei mit FliI, das Zentrum der FliH-Sequenz ist für die Dimerisierung von FliH zuständig (González-Pedrajo *et al.*, 2002; Minamino *et al.*, 2002). FliH bindet an FliN und bringt so

FliI an den C-Ring des Basalkörpers (McMurry *et al.*, 2006). Da FliI jedoch auch ohne FliH mit dem Exportapparat interagieren kann, ist FliH für *E. coli* nicht essentiell (Macnab, 2004; Minamino *et al.*, 2003).

FliJ wurde lange Zeit, auch noch während der Arbeiten zu dieser Dissertation, als allgemeines Chaperon für die Stab- und Hakensubstrate eingeordnet (Minamino *et al.*, 2000a). Jüngere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass FliJ die Chaperone FlgN und FliT jedoch nicht FliS am Exportapparat rekrutiert. FliJ hat Bindestellen für diese Chaperone, die Bindung erfolgt jedoch ohne die Substrate FlgK, FlgL und FliD. FliJ stimuliert die ATPase-Aktivität von FliI, mit einem gebundenem Chaperon ergibt sich dieser Effekt jedoch nicht (Evans *et al.*, 2006). Der C-terminale Bereich von FliJ geht Wechselwirkungen mit der N-terminalen Region von FliH ein und der N-terminale Bereich von FliJ interagiert mit der cytoplasmatischen Domäne von FlhA (Fraser *et al.*, 2003a). In Abbildung 1.5 sind alle Komponenten des cytoplasmatischen Teils des Exportapparates und die Art und Weise, wie ihre Sequenzbereiche vermutlich miteinander interagieren, dargestellt. Im folgenden Kapitel 1.3 werden dann die Substrate und Chaperone des FTTSS, die direkt mit dem Exportapparat in Interaktion treten könnten, näher beschrieben.

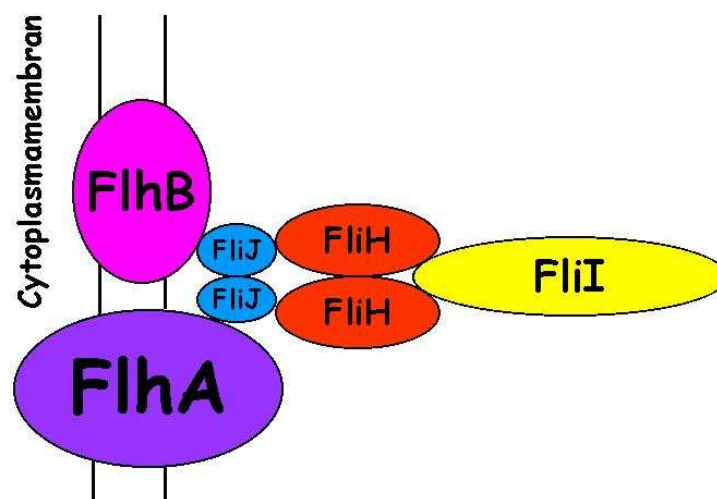


ABBILDUNG 1.5:
Interaktionen zwischen den cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates.

Die zentralen Sequenzbereiche von FliH und FliJ sind jeweils für die Dimerisierung verantwortlich. Die N- und C-terminalen Regionen aller beteiligten Komponenten sind für Interaktionen der Proteine untereinander zuständig (nach Fraser *et al.*, 2003a).

1.3 SUBSTRATE UND CHAPERONE DES FLAGELLÄREN TYP III-SEKRETIONSSYSTEMS

Die Substrate des fTTSS teilen sich in zwei Klassen auf. Die Proteine des Stabtyps (FlgB, C, F, G, J und FliE) und des Hakentyps (FlgD und E) gehören in eine Klasse und die Filamenttypproteine (FlgK, L, M, FliC und D) in eine andere Klasse (Hirano *et al.*, 2003). Einige dieser Substrate benötigen spezifische Chaperone für den Export. Chaperone in TTSS haben ein Molekulargewicht von ca. 15 kDa und einen niedrigen Wert für den isoelektrischen Punkt. Sie haben vermutlich verschiedene Funktionen, wie die Stabilisierung der Substrate und damit die Verhinderung ihrer Faltung und Aggregation. Zudem kommen Chaperone auch als Signal für die Sekretion in Frage und sind damit für die Bestimmung der Hierarchie beim Assemblierungsvorgang des Flagellums von Bedeutung. Einige Chaperone sind auch in die Regulation der Genexpression involviert (Feldman und Cornelis, 2003; He *et al.*, 2004; Karlinsey *et al.*, 2000).

Während der Flagellenbiogenese (Abbildung 1.2) werden zunächst die Komponenten des Stabs und dann die Hakenproteine mit Hilfe der Typ III-Sekretion an den Bestimmungsort gebracht. Das Hakenkappenprotein FlgD ist für die Hakenassemblierung notwendig. Es schließt zunächst den vollendeten Stab ab und wird nach der Herstellung des Hakens aus der flagellären Struktur entlassen (Kutsukake und Doi, 1994; Ohnishi *et al.*, 1994). Die Hakenlänge wird kontrolliert und auf ca. 55 nm und 120 FlgE-Untereinheiten mit Hilfe des Proteins FliK begrenzt (Makishima *et al.*, 2001; Minamino und Namba, 2004; Muramoto *et al.*, 1999). FliK ist durch Termination der Haken- und Initiation der Filamentbildung zusammen mit FlhB in den Substratwechsel des flagellären Exportapparates involviert und wird danach auch exportiert (Minamino *et al.*, 1999b; Minamino *et al.*, 2004; Moriya *et al.*, 2006; Muramoto *et al.*, 1998). Für die Komponenten des Stabs und des Hakens wurde zunächst FliJ als Chaperon vermutet (Bennett und Hughes, 2000). FliJ kommt jedoch wie oben beschrieben eine andere Aufgabe zu, und die Frage nach dem Chaperon für die Stab- und Hakenproteine bleibt zurzeit offen.

Der Export des Filamentproteins FliC wird durch das spezifische Chaperon FliS erleichtert. FliS bindet an den C-terminalen Bereich von FliC und verhindert eine Polymerisation von FliC-Proteinen, aber auch deren Proteolyse vor dem Export (Auvray *et al.*, 2001; Kostyukova *et al.*, 1988; Mimori-Kiyosue *et al.*, 1996; Muskotál *et al.*, 2006; Ozin *et al.*, 2003). Vor FliC, jedoch erst nach der Hakenfertigstellung, werden die beiden Haken-Filamentverbindungen FlgK und FlgL assembliert (Minamino *et al.*, 1999a). Beide sind auch Substrate des Filamenttyps und das gemeinsame Chaperon ist FlgN (Fraser *et al.*,

1999). FlgN gilt jedoch auch als Translationsregulator und Chaperon des Anti- σ -Faktors FlgM (Karinsey et al., 2000; Parsot *et al.*, 2003). Ein weiteres Substrat des Filamenttyps, das Filamentkappenprotein FliD, ist für den Einbau der ca. 30 000 FliC-Untereinheiten essentiell (Diószeghy *et al.*, 2004; Minamino und Namba, 2004; Yonekura *et al.*, 2000) und wird deshalb auch als dessen prozessives Chaperon bezeichnet (Macnab, 2000). Sein eigenes Chaperon ist FliT (Bennett *et al.*, 2001). Die Chaperone FlgN und FliT, nicht jedoch FliS, werden mit Hilfe von FliJ am Exportapparat rekrutiert. Bei den beiden Chaperonen ist die Bindestelle für das jeweilige Substrat und für FliJ identisch. Es erfolgt keine gleichzeitige Bindung von FliJ und Substrat sondern aufgrund unterschiedlicher Affinitäten ein Austausch der Bindungspartner (Evans *et al.*, 2006).

1.4 TYP III-SEKRETIONSSYSTEME IM VERGLEICH

Neben dem fTTSS sind in Gram-negativen Bakterien auch Sekretionssysteme für Virulenzfaktoren oder symbiontische Effektoren vorhanden, die auch dem Typ III-Sekretionssystem (TTSS) entsprechen. Mit Hilfe eines sogenannten Nadelkomplexes, auch Injektisom genannt, werden die Effektoren in eukaryotische Wirtszellen transloziert. Im Falle von Pathogenen kommt es dabei zur Infektion der menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Wirtszelle durch Manipulation ihrer jeweiligen Stoffwechselwege (Cornelis, 2002; Cornelis 2006). Das TTSS sorgt jedoch auch für die Assemblierung von Teilen des Nadelkomplexes im Bakterium und des Translokators in der Cytoplasmamembran der eukaryotischen Wirtszelle (Büttner und Bonas, 2002; Mota *et al.*, 2005). Flagellum und Nadelkomplex haben eine morphologische Ähnlichkeit durch eine vergleichbare strukturelle Organisation. Die Nadel ähnelt z. B. einem verlängerten Flagellenstab (Blocker *et al.*, 2003; Galán und Collmer, 1999; Kubori *et al.*, 1998, Marlovits *et al.*, 2004). Abbildung 1.6 zeigt die beiden Strukturen Flagellum und Nadelkomplex im Vergleich. Die Komponenten des Nadelkomplexes sind nach der Nomenklatur von *Yersinia enterocolitica* benannt. Neben dem morphologischen Erscheinungsbild haben auch die einzelnen Komponenten der verschiedenen TTSS eine hohe Ähnlichkeit auf Primärstrukturebene. Ist diese niedrig, sind trotzdem die physikochemischen Eigenschaften der Proteine ähnlich (Aizawa, 2001; Ghosh, 2004). In *Campylobacter jejuni* wird sogar das fTTSS zum Ausschleusen von Virulenzfaktoren verwendet (Konkel *et al.*, 2004), was neben der Ähnlichkeit in der strukturellen Organisation von Flagellum und Nadelkomplex auch funktionell auf einen evolutionsbiologischen Zusammenhang in der Entwicklung hinweist.

Da die Untersuchungen zum Exportsignal der Typ III-Sekretion (Kapitel 1.5) vor allem mit Substraten der TTSS aus *Y. enterocolitica* und *S. typhimurium* durchgeführt wurden, sollen einige Komponenten hier kurz vorgestellt werden. Die ATPase des Injektisoms wird YscN (Yop secretion) bei *Y. enterocolitica* und InvC bei *S. typhimurium* genannt. Substrate des TTSS bei *Y. enterocolitica*, wie die Translokatoren YopB und YopD, werden mit Yop (Yersinia outer protein), bei *S. typhimurium* mit Sop, Sip (secreted invasion protein) oder Ssp bezeichnet (Blocker *et al.*, 2003; Cornelis und Van Gijsegem, 2000; Hueck, 1998). Auch für Chaperone bestehen Sequenzhomologien und ähnliche Eigenschaften zwischen Flagellum und Nadelkomplex. Die Effektoren SptP und SopE in *S. typhimurium* haben SicP bzw. InvB als Chaperon (Fu und Galán, 1998; Lee und Galán, 2003). Bei *Y. enterocolitica* werden die Chaperone mit Syc (specific Yop chaperone) bezeichnet.

1.5 EXPORTSIGNALLE DER TYP III-SEKRETION

Für den Export der Substrate sind neben den Chaperonen weitere Faktoren von Bedeutung. Auf der Suche nach einem Erkennungssignal der Substrate für den Exportapparat wurde auf Proteinebene keine gemeinsame Konsensussequenz entdeckt. Seitdem wird kontrovers diskutiert, ob dieses Erkennungssignal Protein- oder mRNA-Charakter hat, wobei auch die nicht translatierte 5'-Region der mRNA und der Vorgang der Translation selbst eine Rolle spielen können (Aldridge und Hughes, 2001; Anderson und Schneewind, 1997; Lloyd *et al.*, 2001a).

Untersuchungen zum Problem des Exportsignals wurden anhand der oben beschriebenen Yop-Proteine des TTSS in *Y. enterocolitica* durchgeführt. Die Erkennungssignale für den Export von YopQ, YopE und YopN liegen gemäß Anderson und Schneewind (1997 und 1999) im Bereich der ersten 10 bis 15 Codons der mRNA, da Rasterschubmutationen, bei denen die Aminosäuresequenz aber nicht die mRNA-Sequenz verändert wurde, den Sekretionsvorgang aufrecht erhielten. Bei YopQ scheinen zudem die Mechanismen Translation und Sekretion miteinander gekoppelt zu sein (Anderson und Schneewind, 1999). Für den Transport von YopE und YopQ reichen als Minimalsequenz sogar nur die ersten sieben Codons des 5'-mRNA-Bereichs. Sind in dieser Minimalsequenz jedoch Punktmutationen vorhanden, erfolgt kein Transport. Einen Ausgleich dafür schaffen dann die folgenden 8 bis 15 Codons. Sind diese zusätzlich vorhanden kann wieder ein Export erfolgen (Ramamurthi und Schneewind, 2005).

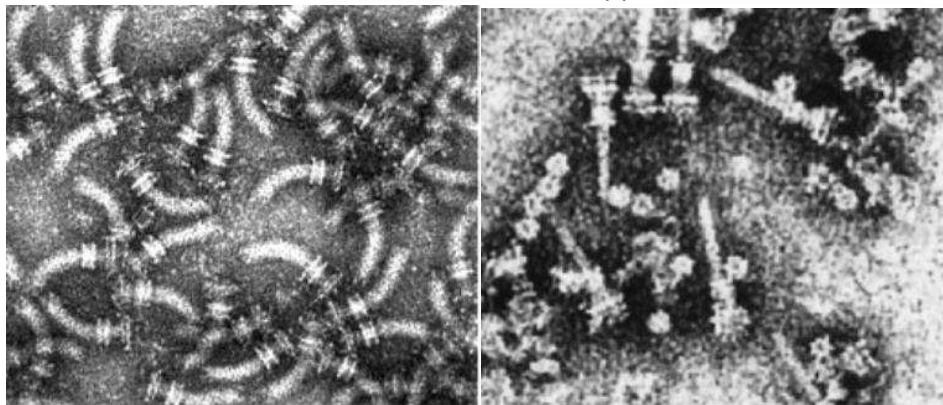
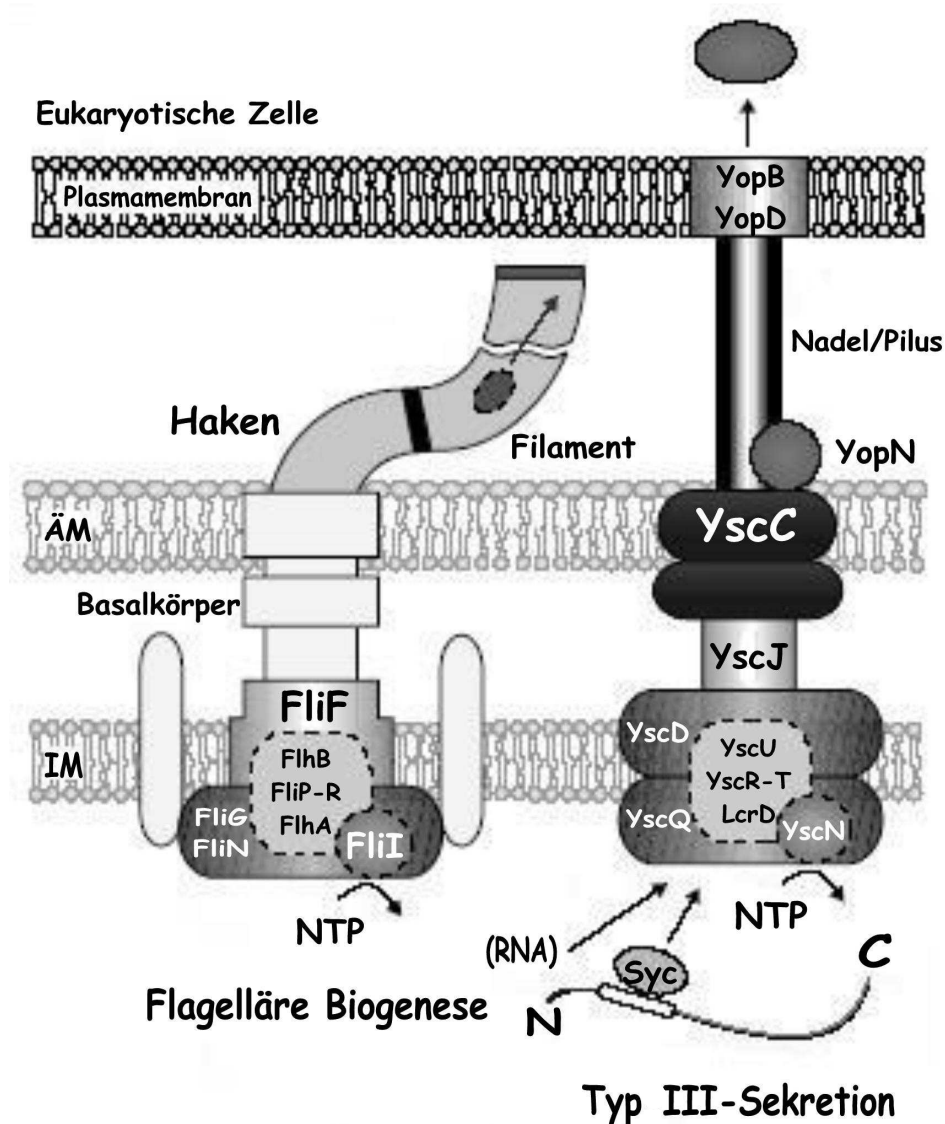


ABBILDUNG 1.6:

Typ III-Sekretionssysteme im Vergleich.

Die obere Abbildung zeigt die schematische Gegenüberstellung der einzelnen Komponenten des Flagellums aus *S. typhimurium* oder *E. coli* und des Nadelkomplexes aus *Y. enterocolitica*. Die unteren elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen links den isolierten Basalkörper-Haken-Komplex des Flagellums und rechts den gesamten Nadelkomplex. Die Höhe der unteren beiden Abbildungen entspricht ca. 400 nm (ÄM = Äußere Membran, IM = Innere Membran; aus Macnab, 2003; verändert aus Thanassi und Hultgren, 2000).

Gemäß Untersuchungen von Lloyd *et al.* (2001a; 2001b; 2002) beinhaltet jedoch die N-terminale Region des Proteins YopE und nicht das 5'-Ende der mRNA das Sekretionssignal. Dabei genügen die Aminosäuren (AS) 1 bis 15 für den Export (Boyd *et al.*, 2000). Was den Charakter des Signalbereichs betrifft, reicht sogar eine synthetische amphipathische Sequenz für den Transport aus (Lloyd *et al.*, 2001b). Solch eine amphipathische Sequenz ist für den Export besser geeignet als eher hydrophobe oder hydrophile Sequenzen (Lloyd *et al.*, 2002). AS 15 bis 50 bilden dann die Bindestelle für das Chaperon SycE. Diese Bindestelle ist nötig, um YopE in seiner ganzen Länge, im Gegensatz zu verkürzten Formen von YopE, in die Wirtszelle zu translozieren. Eine Inhibition des Transports von YopE wird durch die AS 50 bis 77 verursacht. Der inhibitorische Effekt wird mit Hilfe des Chaperons SycE wieder aufgehoben (Boyd *et al.*, 2000). Auch bei SopE in *S. typhimurium* sind die ersten 15 N-terminalen AS wichtig für die Sekretion des Proteins und nicht die mRNA-Sequenz oder der nicht translatierte 5'-Bereich der mRNA (Karavolos *et al.*, 2005). Für ein weiteres Substrat in *Y. enterocolitica* sind die ersten 20 AS für die Sekretion nötig. Dieses Protein YplA kann von allen drei verschiedenen TTSS in diesem Bakterium transportiert werden. Dabei handelt es sich um das plasmidkodierte Ysc-System, welches die Yop-Proteine sekretiert, das chromosomal kodierte Ysa-System welches für die Sekretion der Ysp-Proteine (Yersinia secreted protein) zuständig ist und das Flagellum (Warren und Young, 2005; Young *et al.*, 1999).

Auch zum Erkennungssignal bei Substraten des fTTSS wurden bereits Untersuchungen durchgeführt. Beim Filamentprotein FliC enthält der N-terminale Bereich das Erkennungssignal für den Export (Kuwajima *et al.*, 1989). Dabei handelt es sich um die AS 26 bis 47 in FliC (Végh *et al.*, 2006). Jedoch auch die mRNA und deren nicht translatischer 5'-Bereich von FliC sind für eine effiziente Translation und die Interaktion mit Proteinen wie den Anti- σ -Faktor FlgM und damit für den Export und die Assemblierung des Flagellins von Bedeutung (Majander *et al.*, 2005; Rosu *et al.*, 2006). Ein weiteres Substrat des fTTSS, der bereits genannte Anti- σ -Faktor FlgM, wird unter den Klasse 2-, aber auch unter den Klasse 3-Genen transkribiert. Das FlgN-unabhängige Klasse 2-mRNA-Transkript von FlgM verbleibt im Cytoplasma während das FlgN-abhängige Klasse 3-mRNA-Transkript später sekretiert wird. Dies lässt vermuten, dass FlgM und vielleicht auch andere Substrate beides haben, ein mRNA- und ein Aminosäuresekretionssignal und dass Translation und Sekretion unter Umständen miteinander gekoppelt sind (Karlinsey *et al.*, 2000).

1.6 ZIEL DER ARBEIT

Das TTSS in Gram-negativen Bakterien ist wie zuvor beschrieben essentiell für die Flagellenbiogenese und die Injektion von bakteriellen Effektorproteinen in eukaryotische Wirtszellen. Mit einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen des Sekretionsprozesses können Erkenntnisse zum Transportvorgang der Substrate und zur Flagellenassemblierung gewonnen werden. Diese Erkenntnisse können unter Umständen zu einer Nutzung des bakteriellen Flagellums als Sekretionssystem für heterolog in *E. coli* produzierte Proteine führen und damit von biotechnologischer Bedeutung sein. Untersuchungen am fTTSS können aufgrund der engen Verwandtschaft zum TTSS in Injektisomen auch Hinweise auf deren Funktionsweise und damit Ansätze für die Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren für Infektionskrankheiten bringen.

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung von Interaktionen zwischen löslichen Komponenten des fTTSS von *E. coli* K12. Dabei ergeben sich zwei Schwerpunkte. Zunächst ist von Interesse wie die cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates untereinander und mit ausgewählten Substraten interagieren. Desweiteren sollen Arbeiten zur Lokalisation und Beschaffenheit einer Erkennungssequenz für den Exportapparat bei den Substraten durchgeführt werden. Das führt zu folgender Aufgabenstellung:

1. Herstellung von fTTSS-spezifischen Deletionsmutanten sowie Klonierung von Genen des flagellären Exportapparates für die Etablierung eines plasmidabhängigen Komplementationssystems. Innerhalb dieses Systems soll die Funktionalität der rekombinanten Proteine überprüft werden.
2. Präparation eines möglichen Komplexes, bestehend aus den cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates, FliH, FliI und FliJ, allein oder zusammen mit einem der Substrate FlgD oder FlgE.
3. Reinigung der einzelnen Komponenten des cytoplasmatischen Teils des flagellären Exportapparates und Durchführung von Interaktionsstudien mit den Proteinen FliH, FliI und FliJ unter Verwendung proteinchemischer und biophysikalischer Methoden.
4. Ergänzung und Weiterführung der Studien zur Erkennungssequenz des Substrats FlgD mit Hilfe eines bereits etablierten Testsystems und Untersuchungen zur Erkennungssequenz von FlgE als weiteres Substrat.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

Die in dieser Arbeit als Material verwendeten Chemikalien, Geräte, Kits und Enzyme werden bei den einzelnen Experimenten direkt angegeben. Die gängigen Chemikalien wurden bei Applichem, Fluka, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Die Hersteller der Geräte, Kits und Enzyme werden auch bei den Methoden aufgeführt.

2.1.1 *ESCHERICHIA COLI*-STÄMME UND PLASMIDE

Verwendete Plasmide und deren Herkunft sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. *Escherichia coli*-Stämme, die für Experimente eingesetzt wurden, sind unter Angabe der genauen Stammbeschreibung und Herkunft in Tabelle 2.2 zusammengestellt. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Stämme und Plasmide werden bei den Ergebnissen und im Anhang in den Tabellen 7.3.1 und 7.3.2 aufgeführt.

TABELLE 2.1:
Plasmide und deren Herkunft

Plasmid	Herkunft
pACBSR (Cam ^R)	Herring <i>et al.</i> , 2003
pASK-IBA 3 (Amp ^R)	IBA
pASK-IBA 33 (Amp ^R)	IBA
pASK-IBA 45 (Amp ^R)	IBA
pASK-IBA 5 (Amp ^R)	IBA
pETDuet-1 (Amp ^R)	Novagen
pT7-5 (Amp ^R)	Tabor und Richardson, 1985
pT7-5 <i>putPphoA</i>	Jung <i>et al.</i> , 1998
pUC19 (Amp ^R)	Fermentas

2.1.2 PRIMER

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Invitrogen bezogen. Alle eingesetzten Primer sind in Tabelle 7.2.1 im Anhang zu finden. Gelieferte Primer wurden zunächst in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, H₂O bidest., pH 8,0) gelöst. Für die weitere Verwendung wurde jeweils eine 10 µM-Primerlösung hergestellt.

TABELLE 2.2:
Herkunft und Beschreibung der verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Beschreibung	Herkunft
BL21 (DE3)	[F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)]	Novagen
BL21 (DE3) pLysS (Cam ^R)	[F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (cam ^R)]	Novagen
BT340 pCD20 (Amp ^R)	[F ⁻ Δ (<i>argF-lac</i>)169 Φ 80d <i>lacZ</i> 58(M15) <i>glnV44</i> (AS) λ^- <i>rfbD1 gyrA96</i> (NalR) <i>recA1 endA1 spoT1 thi-1 hsdR17</i>] [λ cI857(ts) <i>ts-rep</i>]	Datsenko und Wanner, 2000
BW25113 pKD46 (Amp ^R)	[F ⁻ Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-4) <i>lacIp-4000</i> (lacI ^Q) λ^- <i>rpoS396</i> (Am) <i>rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>rrnB-4 hsdR514</i>] [<i>oriR101 repA101</i> (ts) <i>araBp-gam-bet-exo</i>]	Datsenko und Wanner, 2000
BW25141 pKD3 (Cam ^R)	[F ⁻ Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-4) <i>lacIp-4000</i> (lacI ^Q) Δ (<i>phoB-phoR</i>)580 λ^- <i>galU95</i> Δ <i>uidA::pir⁺</i> <i>rpoS396</i> (Am) <i>endA9</i> (del-ins):: <i>FRT rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>rrnB-4 hsdR514</i>] [<i>oriR_p</i>]	Datsenko und Wanner, 2000
BW25141 pKD4 (Kan ^R)	[F ⁻ Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-4) <i>lacIp-4000</i> (lacI ^Q) Δ (<i>phoB-phoR</i>)580 λ^- <i>galU95</i> Δ <i>uidA::pir⁺</i> <i>rpoS396</i> (Am) <i>endA9</i> (del-ins):: <i>FRT rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>rrnB-4 hsdR514</i>] [<i>oriR_p</i>]	Datsenko und Wanner, 2000
C41 (DE3)	abgeleitete BL21 (DE3)-Mutante	Miroux und Walker, 1996
C43 (DE3)	abgeleitete BL21 (DE3)-Mutante	Miroux und Walker, 1996
CC181	[F128 <i>lacI^q</i> Δ (<i>ara leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE</i> (am) <i>lacY328</i> (am) <i>recA1</i>]	Calamia und Manoil, 1990
MO1	[F128 <i>lacI^q</i> Δ (<i>ara leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE</i> (am) <i>lacY328</i> (am) <i>recA1</i> Δ <i>flhA</i>]	Weber-Sparenberg et al., 2006
MO2	[F128 <i>lacI^q</i> Δ (<i>ara leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE</i> (am) <i>lacY328</i> (am) <i>recA1</i> Δ <i>flgB-D</i>]	Weber-Sparenberg et al., 2006
DH5 α	[F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-arg F</i>) <i>U169 deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>]	Gibco BRL
EMG2	<i>E. coli</i> K12 Wildtyp, F ⁺ Fnr ⁻	DSMZ
JM109	[<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> λ^- Δ (<i>lac-proAB</i>) F' <i>traD36 proAB⁺ lacI^q</i> Δ M15]	Yanish-Perron et al., 1985

2.2 KULTIVIERUNG UND ZELLAUFSCHLUSS VON *E. COLI*

Übernachtskulturen von *E. coli*-Zellen wurden in 5 ml LB-Medium [10 g Trypton (Becton, Dickenson + Co.), 5 g Hefeextrakt (Applichem), 10 g NaCl, H₂O bidest. ad 1 l] in 20 ml-Reagenzgläsern kultiviert. Das jeweilige Zellmaterial stammte entweder aus einer Glycerinkultur oder von einer Zellkolonie auf einer LB-Platte [10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar (B. Euler, Biotechnologie-Mikrobiologie), H₂O bidest. ad 1 l]. Bei Kulturen für die Analyse von Zellen wurden 800 µl Übernachtskultur in 20 ml LB-Medium in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert. Für die Proteinpräparation aus Zellen wurden 20 ml Übernachtskultur in 1 l LB-Medium in 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane kultiviert. Je nach vorhandener Antibiotikaresistenz der eingesetzten *E. coli*-Stämme wurden 100 µg/ml Ampicillin bzw. Carbenicillin, 50 µg/ml Chloramphenicol oder 34 µg/ml Kanamycin, wenn nötig auch in Kombination, zugegeben. Die Inkubation fand wahlweise bei 37 °C im Inkubationsschüttler (Infors HT) oder bei 30 °C auf einem Schüttelgerät (Infors HT) im Brutraum statt. Die Induktion der Genexpression und damit der Proteinsynthese erfolgte je nach verwendetem Plasmid mit 200 ng/ml AHT (IBA), gelöst in DMF, bei einer OD_{550 nm} von 0,5 (Spectrophotometer U-1500, Hitachi) oder durch 1 mM IPTG (Applichem) bei einer OD_{600 nm} von 0,5 bei 37 °C für 3 h oder bei 30 °C für 4 h. Die erwähnten Glycerinkulturen wurden aus 885 µl Übernachtskultur und 115 µl 87 % Glycerin hergestellt und vor der Aufbewahrung bei -20 bzw. -80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Zellernte kleiner Volumina wurden die *E. coli*-Kulturen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen 10 min bei 4 °C mit 4500 x g pelletiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Das Zellpellet wurde dann in 100 mM KP_i-Puffer, pH 7,5 (83,4 ml 1 M K₂HPO₄, 16,6 ml 1 M KH₂PO₄, H₂O bidest. ad 1 l) resuspendiert, gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 1 ml Puffer aufgenommen. Nach Einstellung der Zellsuspension auf OD_{420 nm} gleich 5 wurden 1 ml-Aliquots in 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen bei 4 °C 5 min mit 2300 x g zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) und die Zellpellets bei -20 °C für die weitere Verwendung gelagert. Zellen aus 1 l-Kulturen wurden in 1 l-Zentrifugenbehältern bei ca. 5000 x g und -20 °C für 20 min zentrifugiert (Sorvall Refrigerated Centrifuge RC-33, Dupont). Danach wurden die Zellpellets in Puffer mit 1 mM β-Mercaptoethanol und 0,5 mM PMSF resuspendiert, vereinigt und in 400 ml-Zentrifugenbehältern bei 4 °C und ca. 10 000 x g für 10 min wieder zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Dupont, SLA 3000-Rotor). Als Puffer wurden die jeweiligen Waschpuffer für die spätere Proteinreini-

gung verwendet. Nachdem das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt wurde, konnten die Zellpellets für die weitere Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

Für den Aufschluss einer großen Anzahl an *E. coli*-Zellen aus 6 l Anzuchtvolumen wurde das eingefrorene Zellpellet wieder in den benötigten Puffern mit 2,5 ml je 1 g Zellen aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe von einer Spatelspitze DNase I (Sigma) wurde der Ansatz 30 min unter Rühren bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte der Aufschluss der Zellen mit dem Zellaufschlussgerät (Constant Cell Disruption Systems, Constant) bei 1,35 kbar für *E. coli*-Zellen nach den Angaben des Herstellers. Der *E. coli*-Zellaufschluss von 20 ml-Kulturansätzen erfolgte durch Ultraschall. Je nach weiterer Anwendung wurden die Zellen nach dem Waschen in 1 bis 3 ml des entsprechenden Puffers zusammen mit einer kleinen Spatelspitze DNase I aufgenommen, in ein spitz zulaufendes 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dann sonifiziert (Sonifier B-12, Cell Disruptor, Branson Sonic Power Company). Dabei wurde die entsprechende Ultraschallspitze („micro tip“) verwendet und nach den Angaben des Herstellers vier 30 s-Pulseinheiten, mit jeweils 1 min Pause zum Abkühlen der Ultraschallspitze dazwischen, je Suspensionsansatz durchgeführt.

Zur Fraktionierung der aufgeschlossenen *E. coli*-Zellen wurden zunächst die Zelltrümmer in 50 ml-Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 4 °C und ca. 10 000 x g pelletiert (Sorvall RC-5C Plus, Dupont, SA 600-Rotor). Danach erfolgte die Ultrazentrifugation des Überstandes in 30 ml-Zentrifugenröhrchen bei 4 °C, ca. 200 000 x g für 1 h (Centrikon T-2070, Kontron Instruments, 50.2 Ti-Rotor). Das Pellet bildete die Membranfraktion, im Überstand befand sich das verdünnte Cytosol. Das Cytosol allein oder das Cytosol einschließlich der Membranen wurde dann direkt für die Proteinreinigung verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C für den weiteren Einsatz gelagert.

Bei der Präparation periplasmatischer Proteine aus *E. coli*-Zellen wurden 20 ml mit 400 µl Übernachtkultur verwendet. Nach Ende der Induktionszeit wurden die Zellsuspensionen noch im Kulturmedium bei OD_{600 nm} angeglichen. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 4500 x g für 10 min bei 4 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Die Zellpellets wurden daraufhin in 15 ml TN-Puffer (10 mM Tris, 30 mM NaCl, H₂O bidest., pH 8,0) resuspendiert und noch mal wie oben beschrieben zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Schließlich wurden die Pellets in 4 ml Saccharosepuffer (20 % Saccharose, 100 mM Tris, 0,5 mM EDTA, H₂O bidest., pH 8,0) resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte wieder eine Zentrifugation. Diesmal wurden die

Zellpellets in 7,5 ml 0,5 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde wieder zentrifugiert. Die periplasmatischen Proteine im Überstand wurden schließlich in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und dort mit eiskalter TCA mit einer Endkonzentration von 10 % 10 min auf Eis oder über Nacht im Kühlschrank gefällt.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Für die Herstellung von Plasmiden für die Genexpression und damit für die Proteinsynthese in *E. coli* wurde das gewünschte Gen aus dem *E. coli*-Genom zunächst mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Danach wurden Vektor und Genfragment restringiert, durch Ligation zusammengefügt und mittels Transformation in den benötigten *E. coli*-Stamm gebracht.

Für die Präparation genomischer DNA aus *E. coli* wurden 10⁹ Zellen des Stamms EMG2 verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kits“ (Qiagen) gemäß Protokoll des Herstellers. Teilweise wurde auch eine schnellere Variante gewählt. Dabei wurden 100 µl Übernachtskultur 5 min mit 2300 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Das Zellpellet wurde danach in 100 µl sterilem H₂O bidest. resuspendiert und für 5 min bei 100 °C inkubiert. Dann wurde die Probe auf Eis gekühlt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur mit 16 100 x g zentrifugiert. Die genomische DNA befand sich schließlich im Überstand.

2.3.1 POLYMERASEKETTENREAKTION

Zu klonierende Gene wurden mit Hilfe der PCR aus genomischer *E. coli*-DNA des Stamms EMG2 amplifiziert. Die PCR-Ansätze (50 µl Gesamtvolumen) mit der *Taq*-Polymerase setzten sich wie folgt zusammen: 36,7 µl H₂O bidest., 5 µl 10 x Polymerasepuffer (Invitrogen), 1,5 µl MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 1,5 µl Primer s (10 µM, Invitrogen), 1,5 µl Primer as (10 µM, Invitrogen), 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM dGTP, dATP, dTTP und dCTP, Promega), 2 µl genomische DNA aus *E. coli* EMG2 als Template, 0,8 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl, Invitrogen). Für die *Pfu*-Polymerase wurden Primer s, Primer as, Template und dNTPs genauso wie bei der *Taq*-Polymerase eingesetzt. Die 5 µl 10 x Polymerasepuffer (Promega) enthielten bereits Mg²⁺-Ionen, von der *Pfu*-Polymerase (3 U/µL, Promega) wurde 1 µl eingesetzt, das Volumen für H₂O bidest. betrug schließlich 38 µl. Wurde ein Plasmid als Template eingesetzt, wurde 1 µl Plasmidpräparation verwendet. Das Volumen für H₂O bidest. wurde entsprechend angepasst.

Das PCR-Temperatur- und -Zeitprofil (Master Cycler Personal, Eppendorf bzw. TGradient, Biometra) bestand aus einer initialen Denaturierung von 3 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 45 °C und 1 bis 2,5 min Elongation bei 72 °C und wurde mit einer finalen Elongation von 5 min bei 72 °C beendet. Die Elongationszeit wurde jeweils der zu amplifizierenden Genfragmentgröße angepasst.

2.3.2 RESTRIKTIONSVERDAU

Die Restriktionsansätze für die Plasmide und die einzufügenden DNA-Fragmente hatten je nach Vektor eine unterschiedliche Zusammensetzung. Die pASK-IBA-Vektoren wurden für die Überexpression von Genen und damit für die Proteinsynthese verwendet. Aufgrund des Vorhandenseins zweier Insertionsbereiche (MCS) mit gleichem Promotor konnte der pETDuet-1-Vektor für die Co-Expression von Genen eingesetzt werden. Sollte später der Transport von Proteinen ins Periplasma nachgewiesen werden, wurden die entsprechenden Gene mit dem Gen für die Alkalische Phosphatase (*phoA*) fusioniert und in den pT7-5-Vektor kloniert.

Für die pASK-IBA-Vektoren 3, 33, 45 und 5 (IBA) wurde der Restriktionsverdau in einem Gesamtvolumen von 20 µl wie folgt durchgeführt: 5 µl Vektor, 2 µl 10 x Puffer 3 [New England Biolabs (NEB)], 2 µl BSA (1:10 verdünnt, NEB), 1 µl *BsaI* (10 U/µl, NEB), 10 µl H₂O bidest. wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl *PstI* (10 U/µl, NEB) in den bereits vorhandenen Ansatz. Die weitere Inkubation erfolgte auch bei 37 °C für 30 min. Schließlich erfolgte die Inkubation der geschnittenen Plasmide für 1 h mit 1 µl CIP (10 U/µl, NEB) bei 37 °C. Vom DNA-Fragment, welches als Insert eingesetzt werden sollte, wurden 28 µl mit 4 µl 10 x Puffer 3 (NEB), 1 µl *BsaI* (10 U/µl, NEB) und 7 µl H₂O bidest. bei 50 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf) für 1 h verdaut. Der Ansatz (40 µl Gesamtvolumen) wurde während der Inkubation mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Ein Kontrollverdau für die pASK-IBA-Vektoren wurde jeweils mit den Enzymen *XbaI* und *HindIII* durchgeführt.

Die PCR-Produkte für die MCS 1 von pETDuet-1 wurden wie folgt verdaut: 28 µl PCR-Produkt, 4 µl 10 x *EcoRI*-Puffer (NEB), 1 µl *EcoRI* (20 U/µl, NEB), 1 µl *HindIII* (20 U/µl, NEB), 6 µl H₂O bidest. (40 µl Gesamtvolumen). Die Zusammensetzung für den Restriktionsverdau der PCR-Fragmente für die MCS 2 von pETDuet-1 ist im Folgenden aufgeführt: 28 µl PCR-Fragment, 4 µl 10 x Puffer 4 (NEB), 1 µl *NdeI* (20 U/µl, NEB), 1 µl *XhoI* (20 U/µl, NEB), 4 µl BSA (1:10 verdünnt, NEB), 2 µl H₂O bidest. (40 µl Gesamtvolumen). Die Restriktionsansätze wurden jeweils für 2 h bei 37 °C inkubiert. Teilweise

wurden die restringierten PCR-Fragmente, welche für den pETDuet-1 bestimmt waren, zunächst in pASK-IBA 3 kloniert und dann in den pETDuet-1 umgesetzt. Die Restriktionsverdau des pETDuet-1-Vektors wurden in 20 µl-Ansätzen durchgeführt. Für den Schnitt der MCS 1 wurden 5 µl Vektor, 2 µl 10 x *EcoRI*-Puffer (NEB), 1 µl *EcoRI* (20 U/µl, NEB), 1 µl *HindIII* (20 U/µl, NEB) und 11 µl H₂O bidest., für die Restriktion von MCS 2 5 µl Vektor, 2 µl 10 x Puffer 4 (NEB), 1 µl *NdeI* (20 U/µl, NEB), 1 µl *XhoI* (20 U/µl, NEB), 2 µl BSA (1:10 verdünnt, NEB) und 9 µl H₂O bidest. zusammen gestellt. Die Inkubation erfolgte auch hier für 2 h bei 37 °C. Beim Umsetzen der Inserts in pETDuet-1 für verschiedene Genkombinationen in MCS 1 und 2 wurden DNA-Mengen von bis zu zwei Restriktionsansätzen mit jeweils 14 µl Plasmidpräparation (Kapitel 2.3.7) benötigt.

Für Klonierungen in das Plasmid pT7-5 *putPphoA* mussten sowohl die PCR-Produkte als auch der Vektor sequenziell zunächst mit *BamHI* und dann mit *NheI* verdaut werden. 10 µl des Plasmids pT7-5 *putPphoA* wurden zunächst mit 2 µl 10 x *BamHI*-Puffer (NEB), 2 µl BSA (1:10 verdünnt, NEB), 1 µl *BamHI* (20 U/µl, NEB) und 5 µl H₂O bidest. für 2 h bei 37 °C inkubiert und dann gereinigt (Kapitel 2.3.3). Die 28 µl pT7-5 *putPphoA* (bereits *BamHI* geschnitten) wurden mit 4 µl 10 x Puffer 2 (NEB), 4 µl BSA (1:10 verdünnt), 1 µl *NheI* (10 U/µl, NEB) und 3 µl H₂O bidest. vereinigt und 2 h bei 37 °C aufbewahrt. Das zu inserierende PCR-Fragment wurde wie folgt verdaut: 28 µl PCR-Fragment, 4 µl 10 x *BamHI*-Puffer (NEB), 4 µl BSA (1:10 verdünnt, NEB), 1 µl *BamHI* (20 U/µl, NEB), 3 µl H₂O bidest. für 2 h bei 37 °C. Danach wurde der Ansatz ebenfalls gereinigt und für den zweiten Verdau eingesetzt. 28 µl bereits *BamHI*-geschnittenes PCR-Fragment wurden mit 4 µl 10 x Puffer 2 (NEB), 4 µl BSA (1:10 verdünnt, NEB), 1 µl *NheI* (10 U/µl, NEB) und 3 µl H₂O bidest. wieder für 2 h bei 37 °C verdaut. Danach erfolgte die Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.4) aller zweimal geschnittenen DNA-Fragmente.

2.3.3 REINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN

PCR- und Restriktionsansätze wurden, wenn die Fragmentgrößen nicht mit Hilfe eines Agarosegels überprüft werden mussten, mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers für die weitere Verwendung gereinigt. Die DNA war schließlich im Elutionspuffer des Kits für Restriktionsverdau (Kapitel 2.3.2) oder H₂O bidest. für Ligationen (Kapitel 2.3.5) gelöst. DNA-Konzentrationen, jeweils 1:30 in einem 60 µl-Volumen verdünnt, wurden photometrisch bei 260 nm bestimmt (Biophotometer 6131, Eppendorf).

2.3.4 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Für die Agarosegelelektrophorese (Mini Subcell bzw. Wide Mini Subcell, BIO-RAD) wurden 1 %ige Agarosegele (peqGOLD Universal Agarose, Peqlab) verwendet, die eine 1 %ige Ethidiumbromidlösung 1:50 000 verdünnt enthielten. Als Größenstandard erfolgte der Einsatz der 2-log DNA-Ladder (New England Biolabs). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 10 x DNA-Probenpuffer (50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau, H₂O bidest.) versetzt und der verwendete Elektrophoresepuffer war TAE (4,84 g Tris, 1,14 ml Essigsäure, 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, H₂O bidest. ad 1 l). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V (Power Pac 300, BIO-RAD).

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Anwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) oder des „MinElute Gel Extraction Kits“ (Qiagen) nach den Protokollen des Herstellers aus dem Gel eluiert und konnten dann weiter verwendet werden. Zum Eluieren wurde wahlweise der im Kit enthaltene Puffer oder H₂O bidest. eingesetzt.

2.3.5 LIGATION

Ein Ligationsansatz bestand aus 28 µl restringiertem PCR-Fragment, 3 µl geschnittenem Vektor, 4 µl 10 x Ligasepuffer [New England Biolabs (NEB)], 0,5 µl T4-Ligase (400 U/µl, NEB) und 4,5 µl H₂O bidest. und wurde bei 16 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf) für 3 h oder über Nacht inkubiert.

2.3.6 TRANSFORMATION

Vor der Transformation wurden chemisch kompetente Zellen präpariert. Dafür wurde zunächst eine 20 ml-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane angesetzt und bei 37 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5 (Spectrophotometer U-1500, Hitachi) inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4 °C und 4500 x g für 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Das Zellpellet wurde daraufhin mit 10 ml, Lösung A (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, H₂O bidest., pH 7,0) gewaschen und noch mal unter der gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 10 ml Lösung B (100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 50 mM CaCl₂, H₂O bidest., pH 6,5) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Diesmal wurde mit 1620 x g für 8 min bei 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml aufgenommen. Davon wurden 200 µl Zellsuspension weiter verwendet. Die Zellen wurden entweder mit einem kompletten Ligationsansatz oder mit 1 µl Plasmidpräparation für 30 min auf Eis inkubiert. Danach

erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Nach 1 min auf Eis wurden dem Transformationsansatz dann 800 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln regeneriert. Schließlich wurden bei einem transformierten Ligationsansatz alle Zellen und bei einer Plasmidtransformation nur 100 µl der Zellen auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotikumkonzentration ausgestrichen und bei 30 oder 37 °C über Nacht inkubiert. Die pASK-IBA-Vektoren wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), die pETDuet-1-Vektoren in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS und die pT7-5-Vektoren mit den *phoA*-fusionierten Genen in Deletionsmutanten des *E. coli*-Stamms CC181 transformiert. Teilweise erfolgte die Transformation von Ligationsansätzen zunächst in die *E. coli*-Stämme DH5α oder JM109. Die Plasmide wurden danach in die benötigten Stämme umgesetzt.

2.3.7 PLASMIDPRÄPARATION

Für die Minipräparation von Plasmiden wurden 5 ml *E. coli*-Übernachtskultur eingesetzt. Mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) erfolgte die Isolierung und Reinigung der Plasmide gemäß Protokoll des Herstellers. Die präparierten Plasmide wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.4 GERICHTETE DELETIONSMUTAGENESE

Für Deletionen von ganzen Genen im Genom von *E. coli* wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Bei der Methode von Datsenko und Wanner (2000) erfolgte eine Transformation von linearen DNA-Fragmenten für den Genaustausch im *E. coli*-Genom, beim Protokoll von Herring *et al.* (2003) wurden dazu Plasmide verwendet. Der zu transformierende Stamm wurde bei der Methode nach Datsenko und Wanner (2000) zunächst mit dem Plasmid pKD46 transformiert (Kapitel 2.3.6). Der Austausch des zu deletierenden Gens erfolgte gegen das Chloramphenicolresistenzgen aus dem Plasmid pKD3. Von diesem Ersatzgen wurden Produkte aus vier PCR-Ansätzen verwendet. Während der PCR wurden dem Gen für die Chloramphenicolresistenz an beiden Enden durch die Wahl der Primer 50 bp lange homologe genomische Sequenzen für den Rekombinationsvorgang angehängt. Vor der Transformation wurden die PCR-Produkte für 2 h bei 37 °C mit *DpnI* verdaut. Die Restriktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 28 µl PCR-Produkt, 4 µl 10 x Puffer 4 [New England Biolabs (NEB)], 1 µl *DpnI* (20 U/µl, NEB) und 7 µl H₂O bidest. (40 µl Gesamtvolumen). Die gereinigten und vereinigten vier Restriktionsansätze (36 µl gesamt) wurden mit 14 µl H₂O bidest. und 450 µl n-Butanol

versetzt, kräftig gemischt und dann bei 4 °C für 10 min mit 16 100 x g zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Das DNA-Pellet wurde daraufhin mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Es wurde wieder wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Schließlich wurde die gefällte DNA getrocknet und für die Transformation in elektrokompente Zellen in 2 µl H₂O bidest. resuspendiert.

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde zunächst der entsprechende *E. coli*-Stamm mit dem Plasmid pKD46 in 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur, 1 ml 20 %ige Arabinoselösung und Ampicillin bis zu einer OD_{600 nm} von 0,7 (Spectrophotometer U-1500, Hitachi) bei 30 °C unter Schütteln in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane kultiviert. Die Zellen wurden danach 30 min auf Eis gekühlt und, verteilt in zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen, bei 4 °C und 4000 x g für 10 min zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Dann wurde zweimal jeweils mit 50 ml eiskaltem H₂O bidest. und einmal mit eiskaltem 10 %igen Glycerin gewaschen. Die Zentrifugationen dazwischen erfolgten jedes Mal wie zuvor beschrieben. Zum Schluss wurden beide Zellpellets vereinigt und zusammen in 120 µl eiskaltem 10 %igem Glycerin aufgenommen. 40 µl-Aliqots wurden dann direkt für die Elektroporation verwendet.

Für die Transformation der DNA-Fragmente in die elektrokompenten Zellen wurden die 40 µl Zellen zu den 2 µl linearer DNA pipettiert und dann in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, BIO-RAD) für den Elektroschock gegeben. Dieser erfolgte mit Hilfe des Ec1-Programms (MicroPulser, BIO-RAD) bei 1 mm-Küvetten oder des Ec3-Programms bei 2 mm-Küvetten. Sofort nach dem Elektroschock wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült und darin 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurde der gesamte Zellansatz auf LB-Platten mit Chloramphenicol ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Später konnte durch Inkubation der Zellen bei 42 °C das hitzesensitive pKD46-Plasmid eliminiert werden. Danach wurde in wiederum chemisch kompetente Zellen das ebenfalls hitzesensitive Plasmid pCD20 zur Entfernung des Chloramphenicolselektionsmarkers transformiert. Die Zellen konnten danach wieder durch Inkubation bei 42 °C von pCD20 kuriert werden.

Mit Hilfe der Methode nach Herring *et al.* (2003) wurde der zu verändernde *E. coli*-Stamm zunächst mit dem Plasmid pACBSR transformiert. Als Austauschgen wurde hier zur Selektion das Kanamycinresistenzgen aus dem Plasmid pKD4 zusammen mit flankierenden homologen Genomsequenzen für den Rekombinationsvorgang von ca. 500 bp Länge in den Vektor pUC19 kloniert und dann in die bereits pACBSR enthaltenen

Stämme transformiert. Das Ausstreichen der Stämme erfolgte auf LB-Platten mit Chloramphenicol und Kanamycin. Eine der erhaltenen Kolonien wurde dann in 1 ml LB-Medium mit Chloramphenicol und 0,2 % Arabinose über Tag bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Kanamycin ausplattiert und bei 37 °C über Nacht selektiert. Da pACBSR nicht hitzesensitiv ist, konnten die damit transformierten Stämme nicht von diesem Plasmid befreit werden. Das ins Genom integrierte Kanamycinresistenzgen konnte dann wieder mit Hilfe des Plasmids pCD20 entfernt werden.

2.5 SEQUENZIERUNG

Sequenzierungen erfolgten durch die Arbeitsgruppe der Speziellen Botanik der Universität Osnabrück und durch den Sequenzierservice des Departments Biologie I der LMU München. Dabei wurde die Amplifikation der Einzelstränge zuvor jeweils nach dem Protokoll und mit den Reagenzien des jeweiligen Labors durchgeführt. Wahlweise wurden auch 30 µl 20 ng/µl PCR-DNA oder 50 ng/µl Plasmid-DNA mit jeweils 30 µl 10 mM Primer zur Sequenzierung an GATC Biotech, Konstanz, geschickt.

2.6 BIOCHEMISCHE METHODEN

Bei der Proteinreinigung kamen unterschiedliche chromatographische Verfahren zum Einsatz. Zwischen den verschiedenen Reinigungsschritten wurden die Proteinlösungen unter Umständen mittels Dialyse umgepuffert oder konzentriert. Abschließend konnten die Proteinproben mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western-blot überprüft werden.

2.6.1 PROTEINREINIGUNG

Bei der Affinitätschromatographie wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt. An Strep-Tactin-Sepharosesäulen konnte der an ein Protein fusionierte Strep-tag II (Aminosäureabfolge: WSHPQFEK) spezifisch binden und dann beim Eluieren durch D-Desthiobiotin kompetitiert werden (Skerra und Schmidt, 2000). Bei der Affinitätschromatographie mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose erfolgte die spezifische Bindung zwischen den Imidazolringen des fusionierten 6 x His-tag (Aminosäureabfolge: 6 x H) und den Ni²⁺-Ionen der Säulenmatrix. Bei der Elution konnte hier die Konkurrenz mit Imidazol durchgeführt werden.

Proteine, die mit einem Strep-tag II fusioniert waren, wurden mit Hilfe 1 ml abgesetzter 50 %iger Strep-Tactin-Sepharosesuspension (IBA) bei 4 °C gereinigt. Das Säulenmaterial wurde zunächst nach den Angaben des Herstellers mit zweimal 4 ml Strep-Tactin-Waschpuffer (100mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, H₂O bidest., pH 8,0) äquilibriert. Danach wurde die Cytosolprobe zusammen mit dem Säulenmaterial in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen für 1 h inkubiert. In einer Durchlaufsäule wurde das Protein dann mit fünfmal 1 ml Strep-Tactin-Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Elution des Proteins mit sechsmal 500 μ l Strep-Tactin-Elutionspuffer [100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM D-Desthiobiotin (IBA), 1 mM β -Mercaptoethanol, H₂O bidest., pH 8,0]. Schließlich konnte die Säule mit dreimal 5 ml Strep-Tactin-Regenerationspuffer [100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA (in 10 x Regenerationspuffer bzw. Puffer R, IBA), H₂O bidest., pH 8,0] für die weitere Verwendung aufbereitet werden.

Bei der Proteinreinigung mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose wurde 1 ml abgesetzte 50 %ige Ni-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen) bei 4 °C verwendet. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 100 ml H₂O bidest. und 50 ml Waschpuffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, H₂O bidest., pH 8,0) gewaschen. Dann wurde das Säulenmaterial zusammen mit der Cytosolprobe in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen für 30 min inkubiert. Danach wurde das Protein in einer Durchlaufsäule jeweils mit 20 ml Waschpuffer mit steigender Imidazolkonzentration von 0 über 10 und 20 bis 50 mM Imidazol gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte schließlich mit 4 ml Elutionspuffer (Waschpuffer mit 200 mM Imidazol).

Die Anionenaustauschchromatographie wurde über 1 ml-„Hi Trap Q FF“-Säulen (Amersham Biosciences) mit Hilfe des „Gradi Frac“-Systems [bestehend aus Valve PSV-50 (0,2 MPa/ 24VDC), Pump P-50, Valve IV-7 (2MPa), Control Unit UV-1, Optical Unit UV-1, Schreiber REC 102 und Fraktionssammler (Pharmacia Biotech)] bei 4 °C durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Säule wurde zunächst mit 5 ml Puffer A (20 mM Tris, 1 mM β -Mercaptoethanol, H₂O bidest., pH 8,0), gefolgt von 5 ml Puffer B (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, H₂O bidest., pH 8,0) gewaschen und dann mit 10 ml Puffer A äquilibriert. Danach erfolgte die Injektion der Probe, die zuvor zweimal in Puffer A dialysiert wurde. Nachdem zunächst ausgiebig mit Puffer A gewaschen wurde, konnte durch fortlaufende Änderung der NaCl-Konzentration durch Mischen der Puffer A und B ein NaCl-Gradient zur Elution des Proteins erstellt werden. Dabei wurden 0,5 ml-Fractionen gesammelt.

Die Proteinreinigung mittels Gelfiltration wurde mit einer „HiLoad 16/60 Superdex 200“-Säule (Pharmacia Biotech) bei 4 °C durchgeführt. Die Gelfiltrationssäule war wie zuvor beschrieben an das „Gradi Frac“-System, (Pharmacia Biotech) angeschlossen. Die Gelfiltrationssäule wurde zunächst mit H₂O bidest. und Strep-Tactin-Waschpuffer (100mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, H₂O bidest., pH 8,0) gewaschen. Die Flussrate betrug immer 0,8 ml/min. Dann wurden das Volumen der Säule durch die Injektion von 1 mg/ml Blue Dextran 2000 (2000 kDa, LMW Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Biosciences) in die Probenschleife auf 58 ml und danach die Elutionsvolumina unterschiedlicher Eichproteine bestimmt. Bei Letzterem wurde jeweils 1 ml Proteinlösung mit den folgenden Proteinkonzentrationen auf die Säule injiziert: 5 mg/ml Albumin (67 kDa) und 5 mg/ml Ovalbumin (43 kDa, jeweils aus dem LMW Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Biosciences), dann 5 mg/ml Catalase (232 kDa), 0,5 mg/ml Ferritin (440 kDa) und 10 mg/ml Thyroglobulin (669 kDa, jeweils aus dem HMW Gel Filtration Calibration Kit, Amersham Pharmacia Biotech) und schließlich 5 mg/ml Aldolase (158 kDa) und 5 mg/ml Cytochrom c (12,5 kDa, jeweils von Boehringer). Von den zu reinigenden und analysierenden Proteinproben wurde auch jeweils 1 ml Proteinlösung verwendet. Dabei wurden sowohl bei den Eichproteinen als auch bei den Proteinproben 2 ml-Fractionen des Säulendurchlaufs gesammelt.

Sollte bereits vorgereinigtes Protein über eine weitere Säule präpariert werden, mussten die Proteinproben zunächst dialysiert werden. Dies erfolgte in Dialyseschläuchen (Servapor dialysis tubing, 16 mm diameter, Serva) in zwei Schritten gegen jeweils 1 l frischen Puffer für mindestens vier Stunden über Tag und dann über Nacht oder umgekehrt im Kühlraum.

Zum Konzentrieren von Proteinproben wurden Filtrierzentrifugenröhrchen unterschiedlicher Volumengröße verwendet. Für bis zu 4 oder 15 ml Volumen wurden „Amicon Ultra-4 bzw. -15 Centrifugal Filter Devices“ (Millipore) verwendet, für geringere Volumina bis zu 500 µl „Nanosep Centrifugal Concentrators“ (Pall Filtron Corporation). Die Zentrifugationsbedingungen wurden nach den Angaben der Hersteller gewählt. Ausschlussgrößen waren für FliH 5 oder 10 kDa, für FliI 10 kDa und für FliJ 5 kDa.

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben erfolgte wahlweise nach Bradford (1976) oder nach Lowry *et al.* (1951) mit Hilfe des Spectrophotometers U-1500 (Hitachi).

2.6.2 POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Nach der Genexpression oder der Proteinreinigung wurden die Proteinproben durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) überprüft. Es wurden dabei entweder Extrakte von Zellen oder angereicherte Proteinlösungen analysiert. Höher molekulare Hybridproteine wurden mit Hilfe von 10 %igen SDS-Minigelen aufgetrennt. Für niedermolekulare Proteine wurden 12,5 %ige SDS-Minigele gegossen.

Die Proteinproben für die SDS-PAGE wurden jeweils mit 10 x SDS-Probenauflaufspuffer (2 g SDS, 5 ml Sammelgelpuffer, 1 ml 0,5 % Bromphenolblau, 3 ml 87 % Glycerin, H₂O bidest. ad 10 ml) und 5 % β -Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 100 °C erhitzt. Zellpellets wurden zuvor in einem Volumen von 140 μ l H₂O bidest. aufgenommen. 20 bis 30 μ l Probe konnten pro Spur aufgetragen werden. Als Proteingrößenstandards wurden „SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range“ (BIO-RAD) oder „Page Ruler, Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet. Bei PhoA-Hybridproteinen wurde jeweils eine Spur mit 5 μ l 1:50 verdünnter Alkalischer Phosphatase (12,3 mg/ml Ammoniumsulfatsuspension, Sigma) als Positivkontrolle für den Immunoblot versehen. Die gelelektrophoretische Auftrennung (Mini-Protean 3 Cell, BIO-RAD) erfolgte bei 150 V (Power Pac 1000, BIO-RAD) mit SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS, H₂O bidest., pH 8,2-8,3).

Bei der nativen PAGE wurden entweder 7,5 %ige Minigele oder 10 %ige große Gele und kein SDS verwendet. Der Lauf der nativen PAGE fand bei 4 °C statt. Bei den 7,5 %igen Minigelen erfolgte der Einlauf der Proben (Mini-Protean 3 Cell, BIO-RAD) bis kurz in den Trenngelbereich hinein bei 75 V (Standard Power Pack P25, Biometra). Danach wurde weiter bei 150 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei großen Gelen fand die Gelelektrophorese (Vertical Slab Gel Unit, Model SE 400, Hoefer Scientific Instruments) über Nacht bei 80 V und 15 mA statt (Standard Power Pack P25, Biometra). Als Standard wurde BSA (Albumin Fraktion V, Applichem) verwendet. Bei einem Minigel wurden 2 μ g BSA aufgetrennt bei einem großen Gel waren es 20 μ g. Bei den Minigelen wurden ca. 20 μ l Proteinprobe bei den großen Gelen ca. 80 μ l je Spur aufgetragen. Native Gele wurden vor dem Blotten (Kapitel 2.6.4) jeweils für 30 min in SDS-Elektrophoresepuffer bei Raumtemperatur äquilibriert

2.6.3 FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN

Proteinbanden in SDS- oder nativen Gelen konnten mit verschiedenen Methoden angefärbt und damit im Gel sichtbar gemacht werden. Von den beiden hier angewendeten Methoden war die Silberfärbung zwar sensitiver, sie eignete sich jedoch nicht zu folgenden massenspektrometrischen Untersuchungen der Proteinbanden wie die Coomassie-Färbung.

Bei der Coomassie-Färbung wurden die Gele nach der Gelelektrophorese zunächst 20 min in Färbelösung I (10 ml 1 % Serva Blue R, 125 ml 2-Propanol, 50 ml Essigsäure) unter Schwenken inkubiert. Danach erfolgte eine 20 min-Inkubation in Färbelösung II (1,5 ml 1 % Brilliant Blau R 250, 50 ml 2-Propanol, 50 ml Essigsäure). Schließlich wurden die Gele für ca. zweimal 30 min mit Entfärbelösung (5 % Essigsäure, 7,5 % Methanol, H₂O bidest.) entfärbt. Teilweise wurde auch „Page-Blue Protein Staining Solution“ (Fermentas) für die Färbung von SDS-Gelen verwendet und dabei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Für die Massenspektrometrie wurden die Proteine in einem 12,5 %igen SDS-Gel geelektrophoretisch aufgetrennt und dann nach einem weiteren Protokoll mit Coomassie gefärbt. Das Gel wurde zunächst in Färbelösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Brilliant Blau R 250) 30 min unter Schwenken inkubiert. Danach wurde in Entfärber I (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) für 30 min entfärbt und schließlich das Gel noch dreimal 30 min in Entfärber II (10 % Essigsäure) gewaschen. Das Ausschneiden der gewünschten Banden erfolgte mit Hilfe eines Skalpell. Sie wurden in H₂O bidest. im Kühlschrank gelagert. Die Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie, wie Waschen, Trypsinbehandlung, Entsalzen, Trocknen und Präparation der Probe, erfolgte in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. K. Jung, Department Biologie I, LMU München. Die MALDI-TOF-Analysen selbst wurden schließlich im Zentrallabor für Proteinanalytik, München, durchgeführt.

Für die Silberfärbung wurde ein nach Blum *et al.* (1987) modifiziertes Protokoll verwendet. Das Gel wurde zunächst für 1 h in Fixierlösung (50 ml Methanol, 12 ml Eisessig, 50 µl 37 % Formaldehyd, H₂O bidest. ad 100 ml) unter Schwenken inkubiert. Danach folgte dreimal Waschen für 20 min mit 50 % Ethanol. Die Thiosulfatlösung (0,04 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O, H₂O bidest. ad 200 ml) wurde für 1 min zum Gel gegeben. Dann wurde das Gel dreimal 20 s mit H₂O bidest. gespült. Nach einer folgenden 20 min-Inkubation mit Imprägnierlösung (0,2 g AgNO₃, 75 µl 37 % Formaldehyd, H₂O bidest. ad 100 ml) wurde abermals dreimal 20 s mit H₂O bidest. gespült. Schließlich wurde das Gel bis zur Färbung der Proteine mit Entwicklerlösung (6g Na₂CO₃, 4 ml Thiosulfatlösung, 50 µl

37 % Formaldehyd, H₂O bidest. ad 100 ml) behandelt. Die Färbung der Proteine wurde durch kurzes Spülen mit H₂O bidest. unterbrochen, dann wurde das Gel in Stopplösung (2,3 g EDTA, H₂O bidest. ad 100 ml) gegeben.

2.6.4 WESTERNBLOT

Für den Westernblot wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.6.2), dann auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und schließlich mittels eines Antikörpers auf der Membran nachgewiesen. Das Blotten der Proteine aus Minigelen (Mini-Trans-Blot Cell, BIO-RAD) erfolgte auf einer Nitrocellulosetransfermembran (Protran, Whatman, Schleicher & Schuell) mit Hilfe von Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, H₂O bidest.) bei 4 °C und 300 mA für 3 h oder 100 mA über Nacht (Standard Power Pack P25, Biometra). Für große Gele wurden nicht industriell hergestellte große Blotkammern verwendet. Nach dem Blotten konnten die Proteine zunächst mit Hilfe einer Ponceaurotlösung (0,2 % Ponceaurot, 3 % TCA, H₂O bidest.) auf der Membran sichtbar gemacht werden. Nach dem Entfärben erfolgten je nach „tag“ unterschiedliche Inkubationsabläufe der Membran bei Raumtemperatur.

Für den Nachweis des Strep-tags II wurde die Membran nach dem Blot zunächst zweimal 5 min mit PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, H₂O bidest.) und 0,5 % Tween 20 inkubiert und danach mit 3 % BSA (Albumin Fraktion V, Applichem) in PBS-Puffer und 0,5 % Tween 20 blockiert. Dann erfolgte dreimal für 5 min ein Waschen mit PBS und 0,1 % Tween 20 und eine 10 min-Inkubation mit Biotin-Blocking-Puffer (IBA) 1:1000 in PBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 verdünnt. Für den Nachweis des Strep-tag II wurde dann für 1 h das Strep-Tactin-HRP-Konjugat (IBA) 1:10 000 verdünnt dazu gegeben. Schließlich wurde zweimal 1 min mit PBS-Puffer und 0,1 % Tween 20 und zweimal 1 min nur mit PBS-Puffer gewaschen.

Der Nachweis des 6 x His-tags erfolgte zunächst durch Äquilibration für zweimal 10 min mit TBS-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, H₂O bidest, pH 7,5). Dann wurde für 1 h mit 3 % BSA (Albumin Fraktion V, Applichem) in TBS-Puffer blockiert. Nach zweimal Waschen in TBS-TT-Puffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X 100, H₂O bidest., pH 7,5) und einmal in TBS-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Antikörper gegen den 6 x His-tag (Penta-His HRP-Conjugate, Qiagen) für 1 h in TBS-Puffer 1:10 000 verdünnt. Daraufhin wurde das Waschen wiederholt.

Was den Nachweis des S-tags (Aminosäureabfolge: KETAAAKFERQHMNS) betrifft, wurde die Membran nach dem Blotten für 10 min in TBS-T-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, H₂O bidest., pH 7,5) äquilibriert. Über Nacht wurde mit 10 % Magermilchpulver (Fluka) in TBS-T-Puffer im Kühlschrank blockiert. Nach dem Blockieren erfolgte für 10 min das Waschen mit TBS-T-Puffer und dann für 1 h die Inkubation mit dem 1:5000 in TBS-T-Puffer verdünnten S-Protein-HRP-Konjugat (Novagen). Zum Schluss erfolgte ein dreimaliges Waschen für 10 min mit TBS-T-Puffer.

Nach dem Blot der PhoA-Hybridproteine erfolgte die Membraninkubation für dreimal 10 min in TBS-T-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,2 % Triton X 100, H₂O bidest.). Blockiert wurde mit 10 % Magermilchpulver (Fluka) in TBS-T-Puffer über Nacht im Kühlschrank. Der erste IgG-Antikörper aus der Maus gegen die Alkalische Phosphatase (Mouse monoclonal antibody to *E. coli* Alkaline Phosphatase, Caltag Laboratories) wurde dann für 1 h 1:5000 verdünnt in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer inkubiert. Danach wurde dreimal für 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Dann wurde der zweite HRP-gekoppelte IgG-Antikörper aus dem Schaf gegen die Maus (sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase, Amersham Biosciences) 1:10 000 verdünnt in TBS-T-Puffer zur Membran für 1 h gegeben. Daraufhin wurde wieder dreimal für 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Nach Behandlung der Nitrocellulosemembranen wurde jeweils die Chemilumineszenzreaktion durch die gekoppelte Meerrettichperoxidase durchgeführt. Dafür wurden als Substrat wahlweise die „Uptilight-HRP-Blot-Reagenzien“ A und B (Interchim) nach Angaben des Herstellers oder die beiden ECL-Lösungen 1 [1 ml 1 M Tris, pH 8,5, 100 µl 250 mM Luminol (gelöst in DMSO), 44 µl 90 mM p-Coumarinsäure (gelöst in DMSO), H₂O bidest. ad 10 ml] und 2 (1 ml 1 M Tris, pH 8,5, 50 µl 30 % H₂O₂, H₂O bidest. ad 10 ml) im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Der Nachweis der Chemilumineszenz erfolgte im Dunkeln mit Hilfe eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences bzw. Röntgenfilm Plus, Euromed) und der Entwicklermaschine (SRX-101A, Konica bzw. Optimax Typ TR, MS Laborgeräte).

2.7 MESSUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN

Während dieser Arbeit wurden zu unterschiedlichen Zwecken Enzymaktivitäten gemessen. Für die Bestimmung der Aktivität der flagellumspezifischen ATPase FliI wurde der ATPase-Test nach Henkel *et al.* (1988) eingesetzt. Sollte der Transport von Proteinen ins Periplasma überprüft werden, konnte die Aktivität des Fusionsproteins Alkalische

Phosphatase mit Hilfe des Tests nach Calamia und Manoil (1990) bestimmt werden. Die Aktivität des cytosolischen Enzyms Isocitradehydrogenase wurde schließlich nach Sottocasa *et al.* (1967) getestet. Dadurch war eine Überprüfung der Lyse von *E. coli*-Zellen möglich.

2.7.1 ATPASE-AKTIVITÄT

Der ATPase-Test wurde nach Henkel *et al.* (1988) jedoch in Mikrotiterplatten durchgeführt. Für die Eichgerade wurden jeweils 50 µl K₂HPO₄-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (0 µM bis 140 µM) verwendet, so dass P_i-Mengen von 0 nmol bis 7 nmol vorlagen. 25 µl Probeansatz bestanden aus 10 µl 5 x ATPase-Puffer (250 mM Tris, 10 mM MgCl₂, H₂O bidest., pH 7,5), 1 µl 10 %ige N-Dodecylmaltosid-Lösung, 4 µl H₂O bidest. und 10 µl Enzymprobe. Kontrollansätze enthielten statt der Enzymprobe nur 10 µl des Puffers in dem sich das Enzym befand. Die Probenansätze wurden für ca. 5 min bei 37 °C präinkubiert. Durch die Zugabe von 25 µl 2 mM ATP-Lösung wurde die Enzymreaktion bei 37 °C (Thermomixer Comfort, MTP-Aufsatz, Eppendorf) für 5 min gestartet und danach durch Zugabe von 200 µl Messreagenz (5,72 % Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat in 6 N HCl : 2,32 % Polyvinylalkohol in H₂O bidest. : 0,0812 % Malachitgrünhydrochlorid in H₂O bidest. : H₂O bidest. im Verhältnis 1:1:2:2) je Ansatz abgestoppt. Die Extinktion der Ansätze wurde bei 620 nm gemessen (Tecan Sunrise) und aufgezeichnet (Software XFluor4).

Die ATPase-Aktivität in nmol P_i · mg⁻¹ · min⁻¹ wurde mit Hilfe der Eichgeraden anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} = [\text{E}_{620 \text{ nm}}(\text{Protein}) - \text{E}_{620 \text{ nm}}(\text{Puffer})] \cdot 1000 \mu\text{g} \cdot 1 \text{ mg}^{-1} \cdot x \mu\text{g Protein}^{-1} \cdot (5 \text{ min})^{-1} \cdot (\text{Steigung der Eichgeraden})^{-1} \text{ nmol P}_i.$$

2.7.2 AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Für die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach Calamia und Manoil (1990) wurden von *E. coli*-Stämmen 20 ml wie in Kapitel 2.2 beschrieben bei 37 °C kultiviert. Beim Ansetzen der Kultur wurden jedoch statt 800 nur 400 µl Übernachtskultur dazu pipettiert. Die Induktion erfolgte mit IPTG. Bei der Zellernte wurde zunächst für 10 min bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Das Zellpellet wurde dann zweimal in 15 ml Waschpuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach erfolgte eine Resuspension der Zellen in nur 1 ml Waschpuffer und das Einstellen der

Zellsuspension auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 2,5. Von dieser Suspension wurden für den Testansatz 0,2 ml in einem 2 ml-Mikrozentrifugenröhrchen verwendet. Für die Kontrolle wurden 0,2 ml TN-Puffer eingesetzt. Des Weiteren bestand der Versuchsansatz aus 0,8 ml des Testpuffers (10 mM Tris, 1 mM $ZnCl_2$, H_2O bidest., pH 8,0), 50 μ l Chloroform und schließlich 25 μ l 0,1 % SDS. Dieser Ansatz wurde sechsmal je Stamm zusammengestellt und dann hintereinander für 4 min bei Raumtemperatur und 4 min bei 37 °C inkubiert. Dabei sollte eine Permeabilisierung der äußeren Membran der *E. coli*-Zellen erfolgen. Durch Zugabe von 200 μ l 0,4 % *p*-Nitrophenolphosphat in Trispuffer (1 M Tris, H_2O bidest., pH 8,0) wurde die Enzymreaktion gestartet. Jeweils drei Ansätze wurden für 2 min bei 37 °C inkubiert, die weiteren drei Ansätze für die doppelte Zeit von 4 min. Die Enzymreaktion wurde mit 500 μ l 2,5 M K_2HPO_4 -Lösung gestoppt. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 16 100 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und vom Überstand der $E_{420\text{ nm}}$ -Wert bestimmt.

Die Berechnung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel und wurde in Millerunits U angegeben:

$$\text{Aktivität} = \Delta E_{420\text{ nm}} \cdot 1000 \cdot (\Delta t \cdot V \cdot OD_{600\text{ nm}})^{-1}$$

$$\text{mit } \Delta t = 2\text{ min, } V = 0,2\text{ ml und } OD_{600\text{ nm}} = 2,5$$

2.7.3 AKTIVITÄT DER ISOCITRATDEHYDROGENASE

Die Aktivität der Isocitratdehydrogenase sollte sowohl für den gesamten Zellextrakt als auch für die Fraktion der periplasmatischen Proteine bestimmt werden. Der Isocitratdehydrogenase-Test wurde nach Sottocasa *et al.* (1967) durchgeführt. Es wurden jeweils Zellen einer 20 ml-Kultur verwendet (Kapitel 2.2). Beim Gesamtzellextrakt wurden 20 ml Zellen einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 2 für 10 min bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert und danach in 10 ml Puffer (100 mM Tris, H_2O bidest., pH 7,5) resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das Zellpellet danach in 3 ml Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Danach wurden die Zelltrümmer 10 min bei 4 °C und 4500 x g pelletiert, der Überstand mit 3 μ l 0,5 M $MgCl_2$ -Lösung versehen und für die Versuchsansätze verwendet. Diese bestanden aus 950 μ l Puffer (200 mM Tris, H_2O bidest., pH 7,5), 650 μ l H_2O bidest., 2 μ l 0,5 M $MnCl_2$ -Lösung, 100 μ l 6 mM $NADP^+$ -Lösung und 100 μ l Zellextrakt. Mit diesem Voransatz wurde der Nullwert im Photometer bei 340 nm und Raumtemperatur gemessen. Danach erfolgte durch Zugabe von 200 μ l 0,1 M Isocitrat-Lösung der Start der Enzymreaktion. Die Zunahme von $E_{340\text{ nm}}$ wurde für 3 min im Photometer (Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter) gemessen. Weitere Versuchs-

ansätze wurden mit 50 und 25 µl Zellextrakt durchgeführt. Was die periplasmatischen Proteine betrifft, wurden auch 20 ml Zellen mit einer $OD_{600 \text{ nm}}$ von 2 verwendet. Danach wurde jedoch wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben weiter verfahren. Für den Versuchsansatz wurden dann 1 ml Puffer (200 mM Tris, H_2O bidest., pH 7,5), 450 µl H_2O bidest., 2 µl 0,5 M $MnCl_2$ -Lösung, 100 µl 6 mM $NADP^+$ -Lösung und 250 µl periplasmatische Fraktion eingesetzt, damit eine gleiche Menge an Ausgangszellen im Vergleich zum Gesamtzell-extrakt vorlagen. Auch hier erfolgte die Messung bei Raumtemperatur und 340 nm und der Start der Reaktion mit 200 µl 0,1 M Isocitrat-Lösung. Weitere Versuchsansätze wurden danach mit 125 und 62,5 µl periplasmatischer Fraktion durchgeführt. Für Negativkontrollen wurden sowohl Versuchsansätze ohne Proteine nur mit Puffer als auch Versuchsansätze mit Proteinen untersucht, die zuvor 15 min bei 100 °C inkubiert worden sind. Die Enzymaktivität wurde in $\mu g \text{ NADPH} \cdot [ml \text{ Zellen } (OD_{600 \text{ nm}} = 2)]^{-1} \cdot min^{-1}$ angegeben.

Die NADPH-Konzentration c wurde mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes und des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH ϵ berechnet:

$$c_{\text{NADPH}} = E_{340 \text{ nm}} \cdot (\epsilon_{\text{NADPH}} \cdot d)^{-1}$$

mit $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und $d = 1 \text{ cm}$

2.8 PLATTENTESTS

Auf Soft-Trypton-Agarplatten konnte durch das Vorhandensein von Wasserkanälen im Weichagar ein Ausschwärmen von beweglichen *E. coli*-Zellen nachgewiesen werden. Enthielten LB-Platten BCIP, das durch die Alkalische Phosphatase in einen blauen Farbstoff umgewandelt werden konnte, erfolgte in einem Schnelltest mittels Blau/Weiß-Selektion ein Nachweis ihrer Enzymaktivität im Periplasma von *E. coli*-Zellen (Michaelis *et al.*, 1983).

2.8.1 MOTILITÄT VON *E. COLI*

Für den Nachweis der Beweglichkeit von Bakterienzellen wurden Zellkolonien der entsprechenden *E. coli*-Stämme von LB-Platten mit einer Impföse als Zellhaufen auf Soft-Trypton-Platten [0,65 % Trypton (Becton, Dickenson + Co.), 0,35 % Agar (B. Euler, Biotechnologie-Mikrobiologie), H_2O bidest.] mit benötigtem Antibiotikum und Induktor gesetzt und 2 Tage bei 30 °C zum Teil im Dunkeln inkubiert.

2.8.2 BLAU/WEISS-SELEKTION

Für die Blau/Weiß-Selektion wurden LB-Platten mit 0,5 mM IPTG (Applichem), 40 µg/ml BCIP (Biomol) und 100 µg/ml Carbenicillin verwendet (Michaelis *et al.*, 1983). Auf diese Platten wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme aus einer Übernachtskultur mit Hilfe einer Impföse ausgestrichen und dann bei 30 °C für 2 Tage im Dunkeln inkubiert.

2.9 PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN

Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinkomponenten des flagellären Exportapparates konnten auf unterschiedliche Weise untersucht werden. Bei der Co-Reinigung von Proteinen aus dem Zellextrakt während der chromatographischen Auftrennung konnte überprüft werden, ob sich bereits in den Zellen bestimmte Proteinkomplexe gebildet haben. Der Affinitätsblot konnte zeigen, ob sich einzelne Proteine *in vitro* aneinander lagern. Surface Plasmon Resonance und Isothermale Titrationskalorimetrie waren dagegen Methoden zur Untersuchung von Art und Stärke der Bindung zwischen zwei einzelnen Proteinen.

2.9.1 CO-REINIGUNG

Für die Co-Reinigung der cytosolischen Proteine des flagellären Exportapparates FliH, FliI und FliJ wurden die in einem Operon liegenden Gene *fliHIIJ* zusammen in den Expressionsvektor pASK-IBA 45 kloniert (Kapitel 2.3.2) und dann überexprimiert. Die Cytosolfraktion aus 6 l Zellkultur (Kapitel 2.2) wurde dann zunächst über die Ni-NTA-Agarosesäule geleitet. Die weitere Reinigung des Eluats erfolgte dann nach der Dialyse über die Strep-Tactin-Sepharosesäule (Kapitel 2.6.1). Danach konnten die im Eluat verbliebenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.6.2) und mit Hilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Nach weiteren Gelelektrophoresen folgten auch die Coomassie-Färbung, mit Auswertungen durch ImageQuant 5.0 oder MALDI-TOF (Kapitel 2.6.3), oder der Westernblot (Kapitel 2.6.4) zur Analyse.

2.9.2 AFFINITÄTSBLOT

Für den Affinitätsblot wurden entweder Zellextrakt oder gereinigte Proteine zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.6.2) und dann auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Kapitel 2.6.4). Bei diesen Proteinen handelte es sich um den ersten Interaktionspartner beim Affinitätsblot. Nach dem Blockieren wurde eine Proteinlösung des zweiten Interaktionspartners zugegeben. Wurden zuvor Proteine mit einem Strep-tag II gelelektrophoretisch aufgetrennt, erfolgte die Membraninkubation mit 6 x His-tag-fusionierten Proteinen über Nacht bei 4 °C unter Schwenken. Sind zunächst Proteine mit einem 6 x His-tag geblottet worden, wurde mit Proteinen mit einem Strep-tag II inkubiert. Danach wurde entweder der Nachweis des 6 x His-tags oder des Strep-tags II jeweils des zweiten Interaktionspartners durchgeführt. Je nach Lage der detektierten Bande konnte das Molekulargewicht des ersten Interaktionspartners bestimmt werden. Von den gereinigten Proteinen, also Interaktionspartner 1, wurden jeweils 5 µg je Spur aufgetragen. Bei der Auftrennung von lysierten Zellen wurde wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben verfahren. Die Proteinlösung von Interaktionspartner 2 wurde in solche Puffer gegeben, mit denen später auch die Antikörperinkubation erfolgte. Von FliH mit einem 6 x His wurden 500 µg Protein pro Membran eingesetzt, bei FliI und FliJ jeweils mit einem Strep-tag II waren es 250 µg.

2.9.3 SURFACE PLASMON RESONANCE

Bei der Surface Plasmon Resonance (SPR) wird die Massezunahme auf einem sogenannten Sensorchip durch die Bindung eines freien Proteins an ein immobilisiertes Protein detektiert. Diese Massezunahme wird in sogenannten „resonance units“ (RU) angegeben, und 1 RU entspricht einer Masseänderung von 1 pg/mm². Das immobilisierte Protein wird als Ligand auf dem Sensorchip fixiert, das freie Protein wird in Lösung als Analyt darüber geleitet.

Für die Immobilisierung von FliI, C-terminal fusioniert mit einem Strep-tag II, wurde ein CM5-Sensorchip (BIAcore) verwendet, auf den zuvor Strep-Tactin (IBA) immobilisiert wurde. Dafür wurde der CM5-Sensorchip in das BIAcore X-Gerät (BIAcore) appliziert und beide Flusszellen des Chips über Nacht mit HBS-EP-Puffer [10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,005 % P20 (BIAcore), H₂O bidest. pH 7,5] mit einer Flussrate von 5 µl/min äquilibriert.

Alle Untersuchungen wurden bei 25 °C durchgeführt und die Vorgänge auf der Chipoberfläche in beiden Flusszellen fortlaufend in Form eines Sensorgramms aufgezeichnet (BIAcore X Control Software, BIAcore). Die Dextranoberfläche der zweiten Flusszelle des CM5-Sensorchips wurde nach der Äquilibration mit Hilfe von EDC (BIAcore) und NHS (BIAcore) im Verhältnis von 1:1 bei einer Flussrate von 10 µl/min für 7 min aktiviert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und damit ca. 400 RU erreicht. Die erste Flusszelle blieb als Referenzzelle bis zu den Interaktionsmessungen unbehandelt. Die Flussrate wurde für die nächsten Durchführungen beibehalten. Nach der Aktivierung der Dextranoberfläche wurde das Strep-Tactin mit einer Konzentration von 50 µg/ml gelöst in einer 10 mM Natriumacetat-Lösung, pH 5,0, ebenfalls für 7 min über die Dextranoberfläche gegeben. Es wurden dabei die erforderlichen ca. 5000 RU an Strep-Tactin auf dem Sensorchip erreicht. Danach erfolgte die Deaktivierung der Dextranoberfläche durch 1 M Ethanolamin, pH 8,5 (BIAcore), auch für 7 min. Die folgende Aktivierung des Strep-Tactins wurde entsprechend der Aktivierung der Dextranoberfläche durchgeführt, jedoch hier nur für 1 min. Dann konnte das zuvor in HBS-EP-Puffer dialysierte FliI mittels des Strep-Tactins an der Sensorchipoberfläche gebunden werden. Dazu wurde mehrere Male die FliI-Proteinlösung über die Oberfläche des CM5-Sensorchips geleitet. Schließlich waren ca. 1000 RU von FliI auf dem Sensorchip vorhanden. Danach wurde wieder mit 1 M Ethanolamin, pH 8,5, deaktiviert.

Für die Messung von Interaktionen von FliI mit weiteren Proteinen wie FliH oder FliJ, beide fusioniert mit einem 6 x His-tag am C-Terminus, wurde die Flussrate auf 30 µl/min eingestellt und Puffer und Interaktionspartner nun über beide Flusszellen geleitet. Es wurden jeweils 40 µl verschiedener Konzentrationen der beiden Proteine zu FliI injiziert. Bei FliH lagen die Konzentrationen zwischen 10 nM und 50 µM, bei FliJ zwischen 1,6 µM und 32 µM für die Proteinlösungen. Beide Proteine wurden auch in Kombination mit Konzentrationen im µM-Bereich nach einer gemeinsamen Inkubation für 30 min auf Eis eingesetzt. Da es sich bei FliI um die flagellumspezifische ATPase handelt, wurde als Modifikation auch 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂ dazu gegeben. Nach den jeweiligen Messungen der Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Regeneration des Liganden vor weiteren Untersuchungen durchgeführt, wenn sich der Analyt nicht allein durch die Flussrate vom Liganden wieder gelöst hatte. Für diese Regeneration wurden wahlweise verschiedene Reagenzien wie 4 M MgCl₂, 5 M NaCl, 10 mM Glycin, pH 3,0, oder 1 bis 20 mM NaOH verwendet. Eine vollständige Regeneration des Liganden war

erfolgt, wenn die RU im Sensorgramm vor und nach der Protein-Protein-Interaktion die gleiche Größenordnung hatten. Teilbereiche der aufgezeichneten Sensorgramme konnten schließlich mit Hilfe der „BIAevaluation Software“ (BIAcore) ausgewertet werden.

2.9.4 ISOTHERMALE TITRATIONSKALORIMETRIE

Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie werden energetische Veränderungen in Form von Wärmezu- oder -abnahme gemessen, wenn zwei Proteine aufeinander treffen. Dazu wird eine Proteinlösung in eine Probenzelle gegeben und die zweite Proteinlösung dazu titriert. Die Temperaturänderung wird im Vergleich zu einer Referenzzelle festgestellt.

Mit Hilfe der Isothermalen Titrationskalorimetrie wurden Wechselwirkungen zwischen FliH und FliJ untersucht. Beide Proteine trugen N-terminal einen Strep-tag II und am C-Terminus einen 6 x His-tag. Für die Messung (CSC5300, Nano ITC Series III, Calorimetry Sciences Corporation) bei 37 °C wurde 1 ml einer 20 µM-Lösung von FliJ in Messpuffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0, H₂O bidest.) in die Probenzelle vorgelegt. Von FliH, im gleichen Puffer, wurden dann 14 mal 7 µl mit einer Konzentration von 200 µM dazu titiert. Die Aufzeichnung der Messung während der Titration und die folgende Auswertung erfolgten mit einer auf Microsoft Windows NT/2000/XP basierenden Begleitsoftware (Calorimetry Sciences Corporation).

3. ERGEBNISSE

3.1 GEWINNUNG VON FTTSS-SPEZIFISCHEN *E. COLI*-DELETIONSMUTANTEN

Als Voraussetzung für die Untersuchung der Funktion der löslichen Komponenten des fTTSS, FliH, FliI und FliJ, wurden zunächst die entsprechenden Gene individuell oder in Kombinationen im Genom der *E. coli*-Stämme CC181 oder EMG2 deletiert. Darauf aufbauend konnte dann ein plasmidabhängiges Komplementationssystem (Kapitel 3.2 und 3.4) etabliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck *E. coli*-Mutanten mit *fliH*-, *fliI*-, *fliJ*-, *fliHI*-, *fliIJ*- und *fliHIJ*-Deletionen generiert. Die hergestellten Deletionsstämme sind in Tabelle 7.3.1 im Anhang aufgeführt.

Die Deletionsmutagenese erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden durch die homologe Rekombination von Antibiotikumresistenzkassetten. Bei der Methode nach Datsenko und Wanner (2000) wurde lineare DNA für den Genaustausch transformiert (Abbildung 3.1). Die linearen DNA-Fragmente wurden mittels PCR hergestellt und bestanden zunächst aus dem Gen für die Chloramphenicolresistenz, welches von dem Plasmid pKD3 amplifiziert wurde. Dieses Gen sollte als Selektionsmarker das zu deletierende Gen im *E. coli*-Genom ersetzen. Das Chloramphenicolresistenzgen war von zwei FRT-Regionen (Ursprung war hier auch das Plasmid pKD3), für dessen späteren Ausschnitt aus dem *E. coli*-Genom, flankiert. Die beiden Enden der linearen DNA bestanden aus homologen Sequenzbereichen (ca. 50 bp lang, waren in den Primern enthalten), die gerade außerhalb des zu eliminierenden Gens angrenzten. Nach Transformation der DNA erfolgte die Rekombination mittels λ -Red-Rekombinase vom ebenfalls transformierten Plasmid pKD46. Die Deletionsmutanten wurden mit Chloramphenicol selektiert. Danach wurde das Plasmid pCD20 in den Deletionsstamm transformiert. Dieses beherbergte ein Gen für die FliP-Rekombinase aus der Hefe, dessen Genprodukt dafür sorgte, dass das Chloramphenicolresistenzgen bei Überlagerung seiner flankierenden FRT-Regionen wieder ausgeschleust wurde.

Die schematische Abfolge des Genaustausches mit der später vorhandenen Deletion im Genom nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) ist am Beispiel des Gens *fliI*, welches für die flagellenspezifische ATPase in *E. coli* kodiert, in Abbildung 3.1 dargestellt. Erfolgreich war diese Methode unter Anwendung der Elektroporation bei Einsatz von ca. 4 μ g linearer DNA gelöst in 2 μ l H₂O bidest. und 40 μ l elektrokompeter Zellen mit einer OD_{600 nm} = ca. 500.

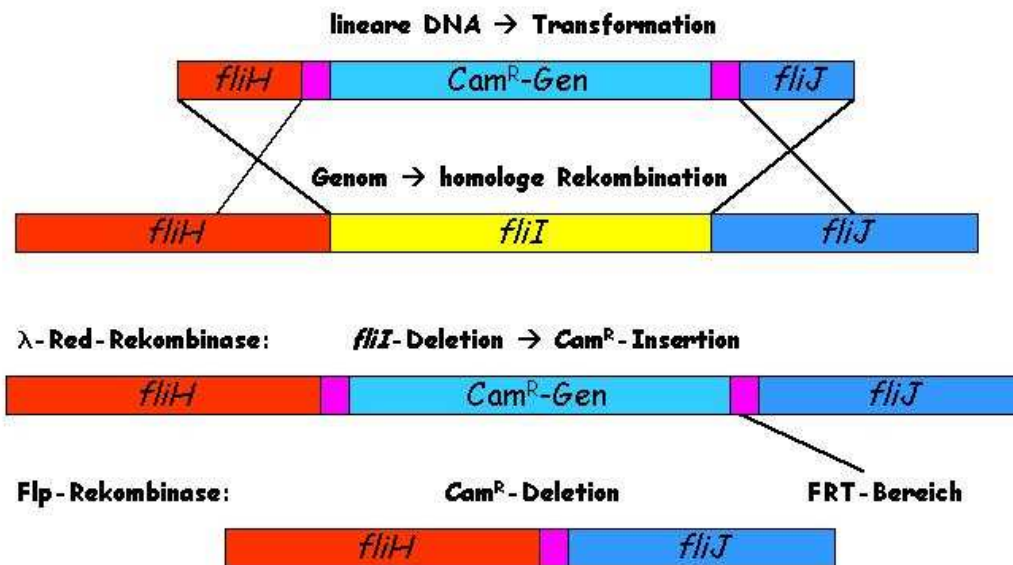


ABBILDUNG 3.1:

Gerichtete Deletion von *fliI* im Genom von *E. coli*.

Nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) wurde lineare DNA mit dem Chloramphenicolresistenzgen als Selektionsmarker transformiert. Danach erfolgten die homologe Rekombination und die Deletion von *fliI* mit Hilfe der λ -Red-Rekombinase. Schließlich wurde auch der Selektionsmarker mit Hilfe der Fli-Rekombinase entfernt.

Bei der zweiten Methode für die Deletionsmutagenese nach Herring *et al.* (2003) wurde das Selektionsgen für den Austausch im Genom in Form eines Plasmids in die zu deletierenden *E. coli*-Stämme CC181 und EMG2 transformiert (Abbildung 3.2). Als Vektor wurde pUC19 verwendet. In diesen Vektor wurden die Produkte von unterschiedlichen PCR-Reaktionen kloniert. Die Abfolge dieser DNA-Fragmente in pUC19 (Tabelle 7.3.2) sah in 5'-3'-Richtung wie folgt aus: Schnittstelle I-SceI für die Linearisierung des Vektors, homologer 5'-Sequenzbereich des zu deletierenden Gens (ca. 500 bp lang, Abschnitt A in Tabelle 7.3.2 im Anhang bzw. das 3'-Ende von *fliI* in Abbildung 3.2), Kanamycinresistenzgen mit flankierenden FRT-Regionen (aus pKD4, Wanner und Datsenko, 2000) als Selektionsmarker und homologer 3'-Sequenzbereich des zu deletierenden Gens (ca. 500 bp lang, Abschnitt B bzw. das 5'-Ende von *fliK*). Abbildung 3.2 zeigt den vollständigen Vektor am Beispiel des zu deletierenden Gens *fliJ*.

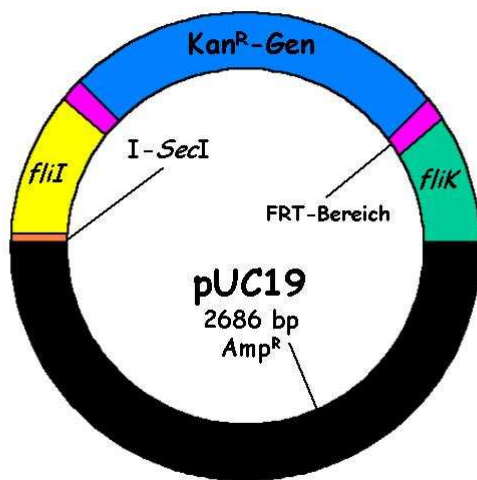


ABBILDUNG 3.2:
Kanamycinresistenzkas-
sette in pUC19 für die
***fliJ*-Deletion in *E. coli*.**
 Der Selektionsmarker war
 von FRT-Regionen und
 homologen Sequenzberei-
 chen von *fliI* und *fliK*
 flankiert und enthielt eine
 I-SceI-Schnittstelle für
 die Linearisierung des
 Vektors.

Vor der Transformation der zu verändernden *E. coli*-Stämme mit dem präparierten pUC19-Vektor wurden die Stämme mit einem weiteren Plasmid pACBSR versehen. Dieses Plasmid kodierte für die λ -Red-Rekombinase und die Meganuklease I-SceI. Die Gene beider Enzyme konnten mit Hilfe von Arabinose induziert werden. Die Meganuklease I-SceI war später für die Linearisierung von pUC19 mit dem auszutauschenden Gen und die λ -Red-Rekombinase für den Rekombinationsvorgang und den Genaustausch verantwortlich. Waren die *E. coli*-Stämme mit beiden Plasmiden ausgestattet, wurden die Zellen in Gegenwart von Arabinose inkubiert. Die Selektion fand danach mit Hilfe von Kanamycin statt. Die im Rahmen dieser Arbeit mit dieser Methode erhaltenen Deletionsstämme konnten nicht von pACBSR kuriert werden. Das Kanamycinresistenzgen wurde mit Hilfe des Plasmids pCD20 wieder entfernt. Die korrekte Lage aller in den *E. coli*-Stämmen CC181 und EMG2 eingeführten Deletionen mit Hilfe der beiden zuvor beschriebenen Methoden wurde durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

Die erhaltenen *E. coli* CC181-Stämme mit Deletionen der Gene *fliH*, *fliI*, *fliJ*, *fliHI*, *fliIJ* oder *fliHIJ* wurden letztlich für Komplementationsanalysen eingesetzt, um die Funktionalität der mit einem „tag“ oder zwei „tags“ versehenen Proteine von FliH, FliI und FliJ *in vivo* zu prüfen. Die funktionellen Proteine sollten dann später in *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen produziert und dann gereinigt in Interaktionsstudien eingesetzt werden.

3.2 KLONIERUNG VON GENEN DES FTTSS

Für die Etablierung des plasmidabhängigen Komplementationssystems und für die Genexpression der cytoplasmatischen Komponenten des Exportapparates einzeln und in Kombinationen wurden für die Klonierung der entsprechenden Gene die pASK-IBA-Vektoren verwendet. Die Genexpression erfolgte über den *tetA*-Promotor durch Induktion mit AHT. Je nach Vektor waren dann die synthetisierten Proteine mit einem Strep-tag II, einem 6 x His-tag oder mit beiden „tags“ fusioniert. Über den jeweiligen „tag“ konnte dann das Protein mittels Immunoblot nachgewiesen bzw. mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt werden. Abbildung 3.3 zeigt als Beispiel die Genkombination *fliHIJ* inseriert in pASK-IBA 45. Dieser Vektor beinhaltet beide „tags“ und nach der Genexpression trägt FliH N-terminal den Strep-tag II und FliJ C-terminal den 6 x His-tag. Bei der Generation eines einzelnen Proteins mit Hilfe des pASK-IBA 45 trägt dieses beide „tags“ und ist N-terminal mit dem Strep-tag II und C-terminal mit dem 6 x His-tag fusioniert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *fliC*, *fliH*, *fliI* und *fliJ* einzeln und in Kombinationen in die verschiedenen pASK-IBA-Vektoren kloniert. Die hergestellten Plasmide sind in Tabelle 7.3.2 im Anhang aufgelistet.

Sollte die Komplexbildung zwischen den cytoplasmatischen Komponenten des Exportapparates mit einem der Substrate untersucht werden, kam der Vektor pETDuet-1 zum Einsatz. Dieser Vektor hatte zwei Insertionsbereiche und es konnten mindestens zwei verschiedene Gene unter dem gleichen Promotor exprimiert werden. Für diese Co-Expression enthält der Vektor vor beiden Insertionsbereichen die Sequenz des T7-Promotors und die Induktion erfolgte mit IPTG. Die Genprodukte konnten dann bereits in der *E. coli*-Zelle *in vivo* interagieren. In die MCS 1 wurden dann jeweils die Gene der cytoplasmatischen Komponenten des Exportapparates einzeln oder in Kombinationen kloniert. Das N-terminale Genprodukt war dabei mit einem 6 x His-tag versehen. In die MCS 2 wurde dann das Gen eines der Substrate kloniert. Das entsprechende Genprodukt war dadurch C-terminal mit einem S-tag markiert. Durch Co-Reinigung (Kapitel 3.5.1) der synthetisierten Proteine oder native Gelelektrophorese des Zellextraktes sollte schließlich überprüft werden, ob ein zuvor in den Zellen gebildeter Komplex auch *in vitro* bestehen blieb und nachweisbar war. Alle hergestellten pETDuet-1-Plasmide sind in Tabelle 7.3.2 im Anhang aufgeführt. Abbildung 3.4 zeigt die Zusammensetzung des Vektors pETDuet-1 für die Co-Expression von *fliHI* und *flgD*.

ABBILDUNG 3.3:
Vektor pASK-IBA 45 mit
Insert *fliHIJ*.

Der Vektor pASK-IBA 45 ist 3265 bp groß und trägt das Ampicillinresistenzgen. Für die Klonierung wurden Vektor und Insert jeweils mit *BsaI* geschnitten. Unter dem *tetA*-Promotor erfolgte die Genexpression. Der 5'-Bereich des Inserts wurde mit dem Strep-tag II und der 3'-Bereich mit dem 6 x His-tag fusioniert.

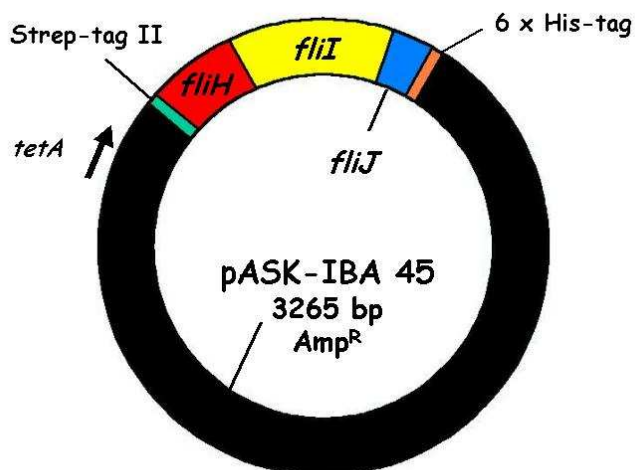
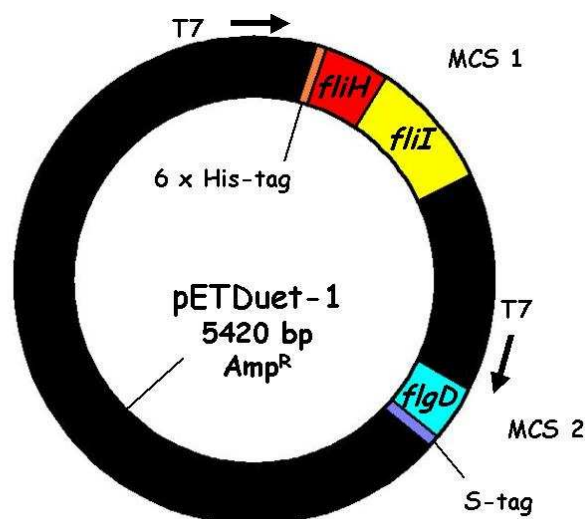


ABBILDUNG 3.4:
Vektor pETDuet-1 mit den
beiden Inserts *fliHI* und
***flgD*.**

Der Vektor pETDuet-1 ist 5420 bp groß und trägt das Ampicillinresistenzgen. Für die Belegung der MCS 1 wurden Vektor und Insert mit *EcoRI* und *HindIII* und für die Klonierung in MCS 2 mit *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Vor beiden Insertionsbereichen liegt der T7-Promotor für die Genexpression. Der 5'-Bereich des Inserts der MCS 1 wurde mit dem 6 x His-tag und der 3'-Bereich der MCS 2 mit dem S-tag fusioniert.



Alle plasmidkodierte Gensequenzen wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die durch die Sequenzierung ermittelten Codonabfolgen für FlgD, FlgE, FliC, FliH, FliI und FliJ stimmten mit den in der Datenbank bei P75936 für FlgD, P75937 für FlgE, P04949 für FliC, P31068 für FliH, P52612 für FliI und P52613 für FliJ unter ca.expasy.org angegebenen Aminosäuresequenzen überein.

3.3 GENEXPRESSION VON *FLGD*, *FLGE*, *FLIC*, *FLIH*, *FLII* UND *FLIJ*

Nach der Plasmidherstellung wurde zunächst die Expression der inserierten Gene überprüft. Bei erfolgter Proteinsynthese konnten die Plasmide dann weiter für die Komplementationsstudien (Kapitel 3.4) und schließlich für die Proteinsynthese mit folgender Isolation der Proteinkomplexe (Kapitel 3.5.1) oder der individuellen Proteinkomponenten (Kapitel 3.5.2) eingesetzt werden.

Die Expression von *fliH*, *fliI* und *fliJ* konnte einzeln und in den Kombinationen *fliHI*, *fliIJ* und *fliHIJ* unter wahlweiser Verwendung der pASK-IBA-Vektoren 3, 33, 45 und 5 nachgewiesen werden. Für die Proteinsynthese dieser cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch den Nachweis über den 6 x His-tag der synthetisierten Proteine aus pASK-IBA 45. Das FliH-Monomer in Spur 1 wurde bei einer Größe von ca. 33 kDa detektiert, obwohl sein theoretisches Molekulargewicht bei 25 050 Da liegt. Das FliH-Dimer zeigt eine Bande bei ca. 70 kDa. Das nicht erwartete Laufverhalten von FliH bei der Gelelektrophorese ist vermutlich auf die beiden „tags“ zurückzuführen. FliI hat ein theoretisches Molekulargewicht von 49 315 Da und wurde beim Westernblot entsprechend bei ca. 50 kDa in den Spuren 2 und 4 nachgewiesen. FliJ mit seinen 17 306 Da zeigt in Abbildung 3.5 auch Banden bei ca. 17 kDa. Dabei liegt das Molekulargewicht von FliJ, wenn es allein und dadurch mit zwei „tags“ synthetisiert wurde, über 17 kDa in Spur 3 und wenn es in Kombination mit FliI oder FliHI dann nur mit einem „tag“ produziert wurde unter 17 kDa (Spuren 5 und 6). Dementsprechend haben die „tags“ auch Einfluss auf das geleelektrophoretische Laufverhalten von FliJ. Bei FliI verändern die „tags“ dagegen das Laufverhalten bei der Gelelektrophorese nicht.

Die Identität der Proteine des cytoplasmatischen Exportapparates wurde nach der Reinigung (Kapitel 3.5.2) durch MALDI-TOF-Analyse untersucht. Bei den synthetisierten FliH aus pASK-IBA 33 (gi:2506422 unter www.ncbi.nlm.nih.gov), FliI (gi:13362148) und FliJ (gi:1071644) jeweils aus pASK-IBA 3 handelte es sich jeweils um die richtigen Proteine. Die in den Klammern angegebenen Nummern aus der Datenbank konnten dabei auf Grund der Verteilung der Peptidmassen nach der Trypsinbehandlung den einzelnen Proteinen zugeordnet werden.

Die Expression von *flgD* aus pASK-IBA 3 zur Synthese des Hakenkappenproteins FlgD (23 575 Da) wird hier nicht gezeigt und erfolgte nur schwach mit einer Bande bei ca. 30 kDa im Westernblot. *fliC* aus pASK-IBA 33, 45 und 5 zur Generation des Filamentproteins FliC (51 163 Da) wurde meistens gar nicht oder unbeständig bei ca. 50 kDa expri-

miert (ohne Abbildung). Vielleicht erfolgte die Synthese der beiden Substratproteine für den flagellären Exportapparat in den BL21 (DE3)-Zellen und nur der Nachweis des „tags“ war aufgrund mangelnder Zugänglichkeit beim Immunoblot nicht möglich. Da für die *E. coli*-Stämme C41 (DE3) und C43 (DE3), beides abgeleitete Mutanten des BL21 (DE3)-Stammes, für ausgewählte Proteine eine besonders gute Synthese beschrieben wurde (Miroux und Walker, 1996), sollte die Genexpression über die pASK-IBA-Vektoren auch in diesen Stämmen durchgeführt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Proteinsynthese in diesen Stämmen (ohne Abbildung) geringer war als in BL 21 (DE3). Die Ergebnisse der Genexpression aller Stämme sind in Tabelle 7.3.3 im Anhang aufgeführt.

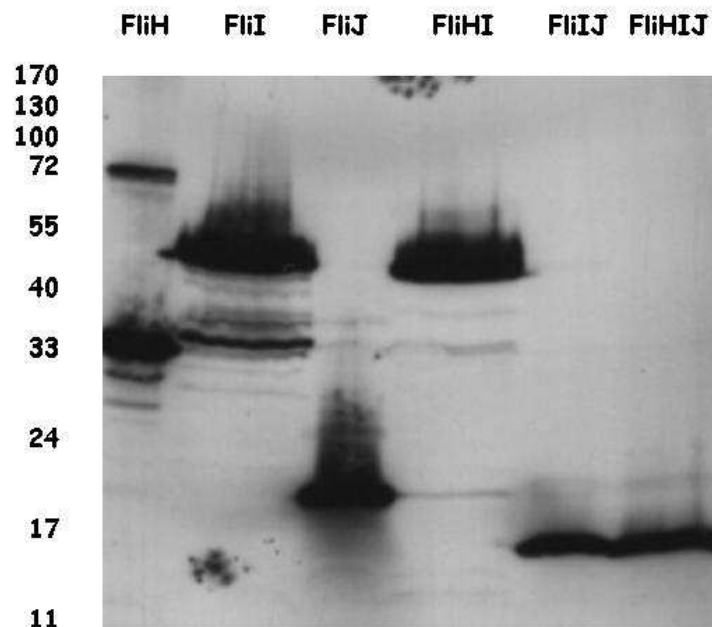


ABBILDUNG 3.5:

Westernblotanalyse der Expression von *fliH*, *fliI* und *fliJ* in *E. coli* BL21 (DE3).

Aufgetragen wurden 20 µl mit Probenpuffer lysierte Zellen ($OD_{420\text{ nm}} = 36$). Links ist das Molekulargewicht in kDA angegeben. Die Proteine FliH (Spur 1), FliI (Spur 2), FliJ (Spur 3), FliHI (Spur 4), FliIJ (Spur 5) und FliHIJ (Spur 6) entstammten dem Vektor pASK-IBA 45, dessen Genprodukte C-terminal den 6 x His-tag trugen. Entsprechend wurden FliI in Spur 4 und FliJ in den Spuren 5 und 6 detektiert.

Damit die cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates zusammen mit deren Substraten synthetisiert werden konnten, erfolgte die Genexpression mit Hilfe des Vektors pETDuet-1 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen. Die Genexpression von *flgD* oder *flgE* erfolgte über die MCS 2 von pETDuet-1 und die von *fliH*, *fliI*, *fliJ*, *fliHI*, *fliIJ* oder *fliHIJ* über die MCS 1 zunächst für beide MCS separat. Abbildung 3.6 zeigt den Immunoblot dieser acht Genprodukte. Die Banden für FliH, FliI und FliJ wurden wieder bei Molekulargewichten detektiert, die den Angaben zu Abbildung 3.5 entsprechen. FlgD hat ein theoretisches Molekulargewicht von 23 575 Da. Die FlgD-Bande erscheint im Westernblot (Abbildung 3.6, Spur 7) entsprechend bei etwa 24 kDa. Auch FlgE, mit 41 914 Da theoretischem Molekulargewicht, zeigte mit einer Bande bei ca. 40 kDa das erwartete Laufverhalten bei der Gelelektrophorese.

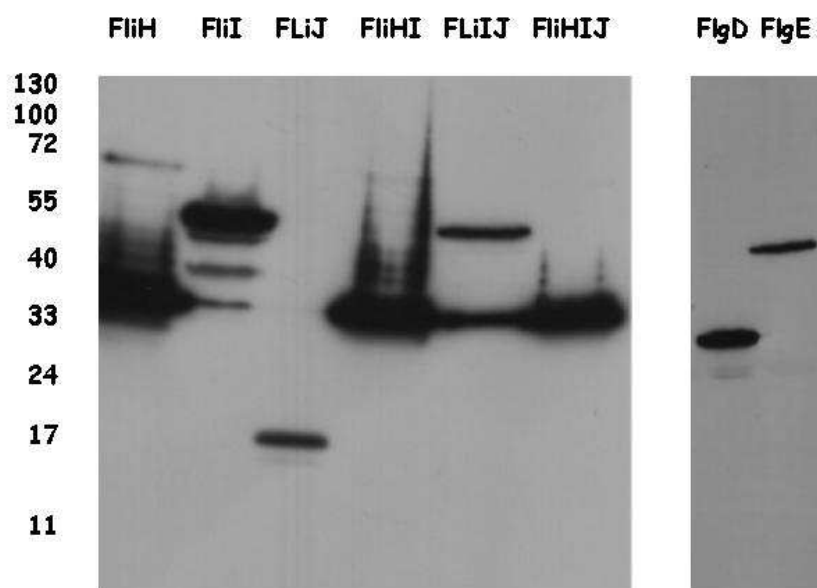


ABBILDUNG 3.6:

Westernblotanalyse der Expression von *fliH*, *fliI* und *fliJ* sowie von *flgD* und *flgE* in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

Aufgetragen wurden 20 µl mit Probenpuffer lysierte Zellen ($OD_{420\text{ nm}} = 36$). Links ist das Molekulargewicht in kDa angegeben. Die Proteine FliH (Spur 1), FliI (Spur 2), FliJ (Spur 3), FliHI (Spur 4), FliIJ (Spur 5) und FliHIJ (Spur 6) mit einem N-terminalen 6 x His-tag wurden über die MCS 1, FlgD (Spur 7) und FlgE (Spur 8) mit einem C-terminalen S-tag über die MCS 2 des Vektors pETDuet-1 generiert. Entsprechend wurden FliH in den Spuren 4 und 6 sowie FliI in Spur 5 detektiert.

Die Proteinkomponenten FliH, FliI, FliJ, FliHI, FliIJ und FliHIJ des Exportapparates wurden auch in Kombination mit FlgD synthetisiert und konnten durch Westernblotanalyse nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Was FlgE betrifft, konnte dessen Produktion bei den Kombinationen mit FliI, FliJ und FliIJ nur schwach mittels Immunoblot detektiert werden, für die Synthese der Proteine FliI, FliJ bzw. FliIJ selbst in Kombination mit FlgE konnte kein Nachweis erbracht werden. Alle weiteren Proteinkombinationen waren nachweisbar. Letztere Westernblots werden hier nicht gezeigt, alle Ergebnisse sind jedoch in Tabelle 7.3.3 im Anhang zu finden.

3.4 MOTILITÄT VON KOMPLEMENTIERTEN DELETIONSMUTANTEN

Mit Hilfe des plasmidabhängigen Komplementationssystems in *E. coli* konnte nach Abschluss der präparativen Arbeiten (Kapitel 3.1 und 3.2) und Bestätigung der Genexpression (Kapitel 3.3) auf Soft-Trypton-Platten überprüft werden, ob die Produkte von plasmidkodierten Genen in der Lage waren, die Deletion im Genom zu ersetzen. Der unveränderte *E. coli*-Stamm CC181 wies einen intakten Flagellenapparat auf, was durch ein ausgeprägtes Schwarmverhalten auf der Soft-Trypton-Platte belegt wurde (Abbildung. 3.7). Durch das Ausschwärmen der Zellen wurde die gesamte Platte getrübt. Wurde als Kontrolle in den Stamm CC181 einer der pASK-IBA-Vektoren mit inseriertem Gen transformiert, erfolgte das Ausschwärmen der Zellen auf Soft-Trypton-Platten, mit enthaltenem Antibiotikum und Induktor, dann ringförmig und nicht so stark (ohne Abbil-

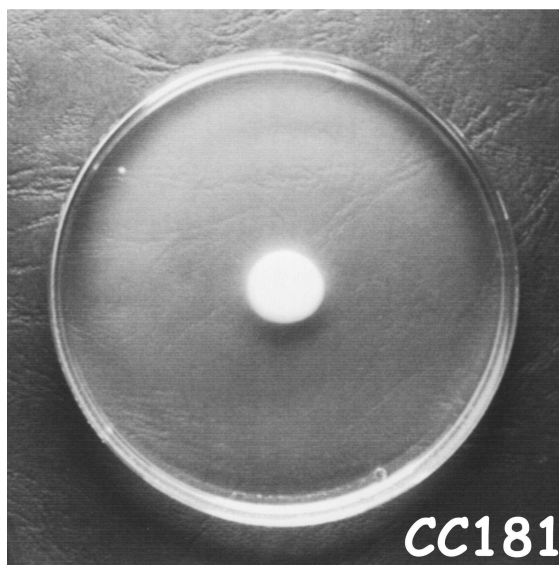


ABBILDUNG 3.7:
Motilität von *E. coli* CC181 auf einer Soft-Trypton-Platte.

In der Mitte befindet sich Zellmaterial des beweglichen *E. coli*-Stammes CC181. Die Zellen sind über die gesamte Soft-Trypton-Platte geschwärmt und haben somit die gesamte Oberfläche der Platte getrübt.

dung). Die Beweglichkeit von CC181 wird vermutlich durch die verstärkte Synthese einzelner Proteinkomponenten gehemmt. Bei den folgenden Komplementationen konnte entsprechend auch nur ein ringförmiges Ausschwärmen der Zellen und keine vollständig getrübbte Platte erwartet werden.

Die in den *E. coli*-Stamm CC181 einzeln (*fliH*, *fliI* und *fliJ*) und in Kombinationen (*fliHI*, *fliIJ* und *fliHIJ*) eingefügten Deletionen bezüglich der cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates sorgten dafür, dass der Stamm nicht mehr motil war (erste und dritte Reihe in Abbildung. 3.8). Die Komplementation erfolgte durch Synthese der Proteine mit Hilfe der pASK-IBA-Vektoren. Es zeigte sich, dass die Wiederherstellung der Beweglichkeit der Zellen davon abhängig war, auf welche Art und Weise das synthetisierte Protein mit einem „tag“ versehen war. Was den pASK-IBA-Vektor 45 betrifft, konnte nur bei den Ansätzen *fliJ*, *fliHI*, *fliIJ* und *fliHIJ* eine Komplementation erreicht werden (zweite und vierte Reihe in Abbildung 3.8). Hier zeigt sich das erwartete ringförmige Ausschwärmen der Zellen. Bei den Ansätzen *fliH* und *fliI* ist keine Beweglichkeit der Zellen vorhanden. FliH und FliI waren durch den 6 x His-tag am C-Terminus und/oder den Strep-tag II am N-Terminus vermutlich in ihrer Funktion gestört.

Auch die pASK-IBA-Vektoren 3 und 33 wurden für die Komplementationsstudien eingesetzt. In diesem *in vivo*-Test zeigte sich, dass ein C-terminaler Strep-tag II oder 6 x His-tag FliI und FliJ in ihrer physiologischen Funktion nicht störten. Eine Komplementation der *fliH*-Deletion konnte jedoch nur mit Hilfe von FliH, versehen mit einem C-terminalen 6 x His-tag, erreicht werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Motilität, basierend auf dem plasmidabhängigen Komplementationssystem, sind in Abbildung 3.9 schematisch zusammengefasst.

Zuvor wurden noch andere *E. coli*-Stämme als CC181 auf ihr Schwarmverhalten hin untersucht. Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), der für die Expressionsstudien eingesetzt wurde, zeigte auf den Soft-Trypton-Platten keinen beweglichen Phänotyp und eignete sich daher nicht für die Deletionsmutagenese und folgende Komplementation. Ein weiterer *E. coli*-Stamm EMG2 war zwar ohne Deletion beweglich, diese Beweglichkeit wurde jedoch durch die Transformation mit den pASK-IBA-Plasmiden noch stärker eingeschränkt als bei CC181. EMG2 konnte daher auch nicht für die Komplementationsstudien eingesetzt werden. Alle durchgeführten Untersuchungen zur Motilität von *E. coli*-Stämmen auf Schwarmagarplatten, auch die bereits in den Abbildungen 3.7 bis 3.9 dargestellten Ergebnisse, sind im Anhang in Tabelle 7.3.3 zusammenfassend mit der untersuchten Genexpression aufgeführt.

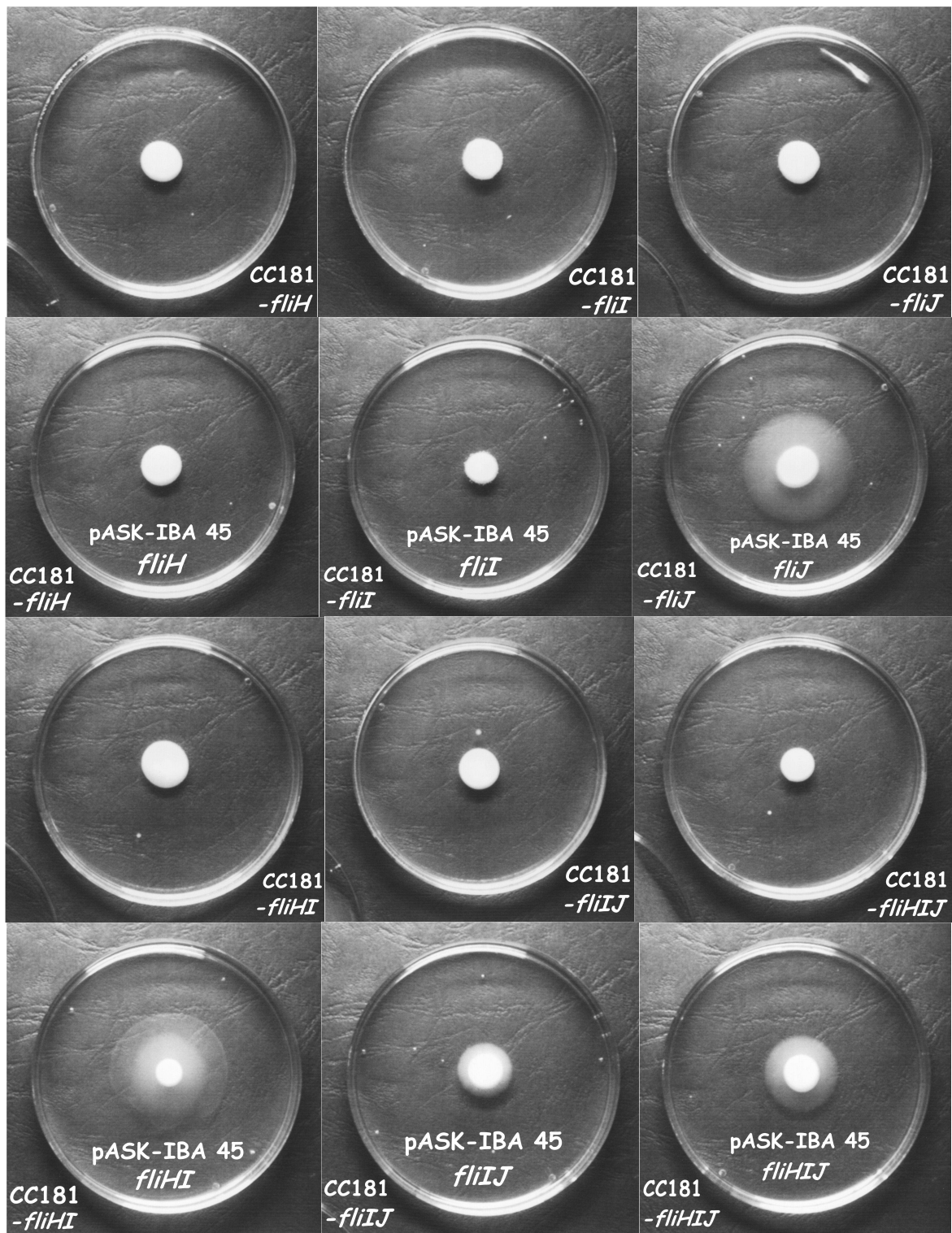


ABBILDUNG 3.8:
Motilität von deletiertem und komplementiertem *E. coli* CC181 auf Soft-Trypton-Platten.

Die erste und die dritte Reihe zeigen die unbeweglichen Deletionsmutanten bezüglich der cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates *fliH*, *fliI* und *fliJ* einzeln und in Kombinationen. In der zweiten und vierten Reihe sind die genetischen Komplementationen mit Hilfe des Vektors pASK-IBA 45 abgebildet. Von diesen sind die Ansätze *fliJ*, *fliHI*, *fliIJ* (schwach) und *fliHIJ* beweglich, die Zellen sind ringförmig ausgeschwärmt.

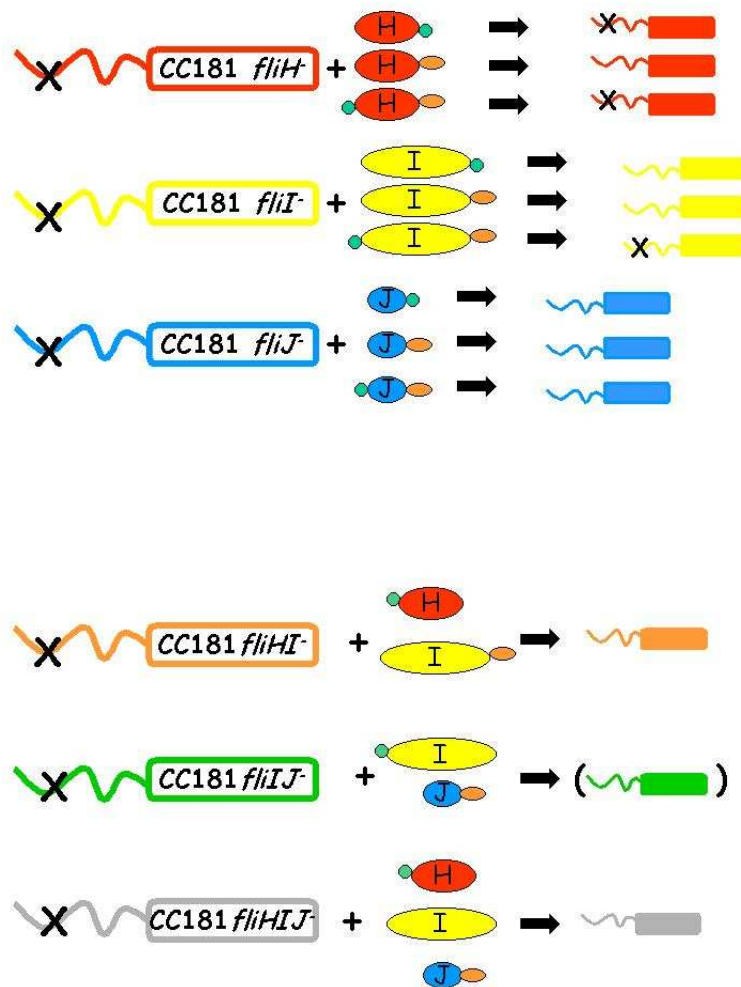


ABBILDUNG 3.9:

***E. coli*-CC181-Deletionsstämme und deren Komplementation.**

Alle Deletionsmutanten (*fliH* in rot, *fliI* in gelb, *fliJ* in blau, *fliHI* in orange, *fliIJ* in grün und *fliHIJ* in grau) sind unbeweglich. Die Unbeweglichkeit ist mit einem X durch das Flagellum gekennzeichnet. Die Proteine (rot für FliH, gelb für FliI und blau für FliJ) zur Rückgewinnung der Beweglichkeit entstammten den pASK-IBA-Vektoren 3 (Strep-tag II am C-Terminus, kleine grüne Kreisfläche), 33 (6 x His-tag am C-Terminus, kleine orange Ellipse) oder 45 (Strep-tag II am N-Terminus und 6 x His-tag am C-Terminus). Bei den Kombinationen im unteren Bildabschnitt sind die „tags“ je nach Lage des Gens im Operon auf die verschiedenen Proteine verteilt. FliH hatte den Strep-tag II am N-Terminus und FliI den 6 x His-tag am C-Terminus bei *fliHI*. Bei der Kombination *fliIJ* war FliI mit dem Strep-tag II am N-Terminus und FliJ mit dem 6 x His-tag am C-Terminus verbunden. *fliHIJ* generierte schließlich FliH mit einem N-terminalen Strep-tag II, FliI ohne „tag“ und FliJ mit einem C-terminalen 6 x His-tag. Nur die Stämme CC181 *fliH*, komplementiert mit FliH mit C-terminalen Strep-tag II oder N-terminalen Strep-tag II und C-terminalen 6 x His-tag, und CC181 *fliI*, komplementiert mit N-terminalem Strep-tag II- und C-terminalem 6 x His-tag-tragenden FliI, zeigten keine Motilität und CC181 *fliIJ* pASK-IBA 45 *fliIJ* war nur schwach beweglich (Darstellung in Klammern).

Die in Abbildung 3.9 schematisch dargestellten Komplementationsstudien brachten schließlich Hinweise darauf, welche Stämme zur Synthese aktiver Proteine für die Interaktionsstudien eingesetzt werden sollten. Dafür boten sich die Stämme an, bei denen eine Wiederherstellung der Beweglichkeit erreicht wurde. Bei diesen Stämmen waren die rekombinanten Proteine zumindest *in vivo* funktionell. Das galt für rekombinantes FliI und FliJ mit C-terminalen Strep-tag II aus pASK-IBA 3 oder 6 x His-tag aus pASK-IBA 33. FliJ aus pASK-IBA 45 war zudem mit beiden „tags“ aktiv, FliH dagegen nur mit einem 6 x His-tag am C-Terminus aus pASK-IBA 33. Auch rekombinantes FliHIJ aus pASK-IBA 45 mit einem Strep-tag II am N-Terminus von FliH und einem C-terminalen 6 x His-tag an FliJ waren funktionell und konnten für die chromatographische Co-Reinigung (Kapitel 3.5.1) eingesetzt werden. Aus den Studien mit den kombinierten Genen wurde auch ersichtlich, dass ein Strep-tag II am N-Terminus von FliH nicht stört. Ein Strep-tag II am N-Terminus von FliI schränkt dessen Aktivität dagegen etwas ein.

3.5 INTERAKTIONEN ZWISCHEN FLIH, FLII, FLIJ UND SUBSTRATEN

Für die Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen FliH, FliI, FliJ mit und ohne Substrat wurden zwei verschiedene experimentelle Wege eingeschlagen. Beim ersten Ansatz sollte mit Hilfe von Genexpression und folgender Co-Reinigung (Kapitel 3.5.1) direkt eine Komplexbildung der einzelnen Proteine in *E. coli*-Zellen überprüft werden. Im zweiten Ansatz sollten die Proteine individuell synthetisiert und gereinigt (Kapitel 3.5.2) werden, um sie in Interaktionsexperimenten wie Affinitätsblot (Kapitel 3.5.5), isothermale Titrationskalorimetrie (Kapitel 3.5.6) und Surface Plasmon Resonance (Kapitel 3.5.7) einsetzen zu können.

3.5.1 CO-REINIGUNG VON FLIH, FLII, FLIJ UND SUBSTRATEN

Nach der Synthese von FliH, FliI und FliJ konnte mittels Co-Reinigung überprüft werden, ob die einzelnen Komponenten zusammen einen Komplex bilden. Dafür wurden *fliHIJ*, die Gene liegen in dieser Reihenfolge in einem Operon, mit Hilfe des Plasmids pASK-IBA 45 in *E. coli*-BL21 (DE3)-Zellen zusammen exprimiert. Die Reinigung des Komplexes aus dem Zellextrakt erfolgte im ersten Schritt zunächst über den C-terminalen 6 x His-tag von FliJ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Bei der nachfolgenden Westernblotanalyse konnte der 6 x His-tag von FliJ nachgewiesen werden (Abbildung 3.10, Spur 2). Das parallel gefertigte Coomassie-Gel zeigt in Spur 1 neben der Bande von FliJ noch weitere Banden. Das Eluat von der Ni-NTA-Agarosesäule wurde dann über die

Strep-Tactin-Sepharosesäule geleitet. Hier erfolgte die spezifische Bindung über den N-terminalen Strep-tag II von FliH. Der Immunoblot (Spur 4) zeigt die Bande von FliH durch den Strep-tag II-Nachweis. Auch nach diesem Reinigungsschritt sind im Coomassie-Gel neben der Bande von FliH noch weitere Banden zu erkennen (Spur 3). Beim Coomassie-Gel in Spur 5 und beim Silbergel in Spur 6 der zehnfach konzentrierten FliHIJ-Probe sind alle Banden verstärkt zu sehen. Durch die Silberfärbung konnten Banden bei Molekülgrößen von FliI bei ca. 50 kDa, FliH oberhalb von ca. 30 kDa und FliJ unterhalb von ca. 20 kDa sichtbar gemacht werden.

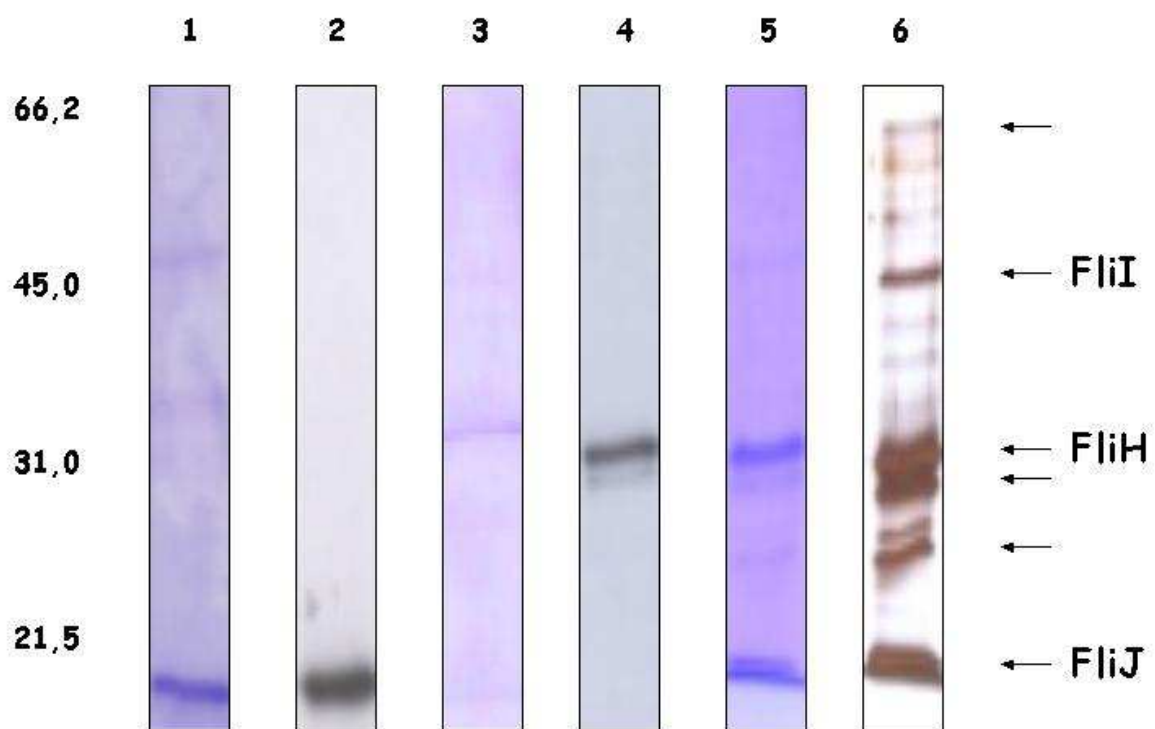


ABBILDUNG 3.10:

Gefärbte SDS-Gele und Immunoblots des FliHIJ-Komplexes nach der Co-Reinigung aus dem Zellextrakt von *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA 45.

Links ist das Molekulargewicht in kDa angegeben. Spur 1 zeigt das Coomassie-Gel und Spur 2 den Immunoblot des Eluats nach der Reinigung des Zellextraktes über die Ni-NTA-Agarosesäule. In beiden Spuren ist die Bande von FliJ und beim Coomassie-Gel sind auch noch weitere schwache Banden zu sehen. Die folgenden Spuren 3 (Coomassie-Gel) und 4 (Immunoblot) zeigen jeweils die Bande von FliH nach der Reinigung des Eluats aus Spur 1 mit Hilfe der Strep-Tactin-Sepharosesäule. In den Spuren 5 (Coomassie-Färbung) und 6 (Silberfärbung) ist die zehnfach konzentrierte Probe aus Spur 3 mit Banden von FliH, FliI und FliJ zu sehen. Die sechs Pfeile rechts markieren die Banden, von denen eine MALDI-TOF-Analyse durchgeführt wurde.

Durch MALDI-TOF-Analysen konnte sowohl das FliH-Monomer (gi:90111357 unter www.ncbi.nlm.nih.gov) als auch das FliH-Dimer (Abbildung 3.10, erster Pfeil von oben) und Abbauprodukte von FliH (vierter Pfeil von oben) identifiziert werden. Auch die Bande von FliI wurde als solche bestätigt (gi:75239165). Obwohl FliJ durch die Westernblotanalysen bestätigt wurde, erfolgte durch die MALDI-TOF-Analyse vermutlich aufgrund von Kompressionen im unteren Bereich des Coomassie-Gels kein Nachweis. Für die Proteinbande, welche der fünfte Pfeil von oben in Abbildung 3.10 markiert, wurde die BCCP-Untereinheit des Biotincarrierproteins Acetyl-CoA-Carboxylase (gi:24053732) ermittelt. Dieses Protein konnte aufgrund seiner Eigenschaften mit Strep-Tactin interagieren. Die Ergebnisse zeigten, dass der postulierte FliHIJ-Komplex während der Reinigung über die beiden Säulen intakt blieb und belegen damit die Existenz eines entsprechenden cytoplasmatischen Proteinkomplexes.

Für die Ermittlung der Stöchiometrie der einzelnen Komponenten im FliHIJ-Komplex zueinander, wurde das Coomassie-Gel (Spur 5 in Abbildung 3.10) mit Hilfe von ImageQuant 5.0 ausgewertet und dabei die Volumina der einzelnen Banden bestimmt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Molekulargewichte konnte ein molares Verhältnis von FliH zu FliI zu FliJ von 30:1:10 ermittelt werden, wenn die FliH-Abbauprodukte mit einbezogen wurden. Das Verhältnis von FliH zu FliJ war dann entsprechend 3:1. Wurden die Abbauprodukte von FliH nicht berücksichtigt, betrug das FliH-FliI-FliJ-Verhältnis 20:1:10. Der Anteil von FliI im FliHIJ-Komplex war sehr gering. Bei FliI, wie auch bei anderen an den Komplex bindenden Proteinen, könnte es zu Verlusten durch das Waschen während der beiden Reinigungsschritte gekommen sein.

Nach der Expression der in den Vektor pETDuet-1 klonierten Gene sollte auch eine Co-Reinigung diesmal des FliHIJ-Komplexes jeweils zusammen mit einem der beiden Substrate FlgD (Hakenkappe) oder FlgE (Haken) erfolgen. In diesem Fall wurde nur über die Ni-NTA-Agarosesäule gereinigt, an die FliH mit seinem 6 x His-tag am N-Terminus binden konnte. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Eluats waren in einem Coomassie gefärbten SDS-Gel noch sehr viele Banden zu erkennen. Mit Hilfe des Immunoblots konnte der 6 x His-tag von FliH nur sehr schwach nachgewiesen werden (ohne Abbildung), der C-terminale S-tag an FlgD bzw. FlgE konnte dagegen nach dem Blotten nicht immunologisch detektiert werden. Eine Komplexbildung der drei cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates zusammen mit einem Substrat war auf diesem Weg nicht nachweisbar. Auch mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese und folgendem Immunoblot wurden die Komponenten des FliHIJ-Komplexes in verschiedenen

Kombinationen zusammen mit FlgD im Zellextrakt untersucht. Hier konnte nur FliH bei einem Molekulargewicht von ca. 200 bis 250 kDa nach der Expression aus pETDuet-1 *fliHflgD* nachgewiesen werden. Da FliI aufgrund eines fehlenden „tags“ und der S-tag von FlgD nicht zu detektieren waren, kann keine Aussage über die verhältnismäßige Zusammensetzung des Komplexes von FliH, FliI und FlgD zueinander getroffen werden.

Zusammenfassend konnte mittels der Co-Reinigung ein Komplex der cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates, FliH, FliI und FliJ, präpariert und durch SDS-PAGE, Westernblot- und MALDI-TOF-Analyse bestätigt werden. Eine Interaktion dieses Komplexes mit einem der Substrate FlgD oder FlgE konnte dagegen mit dieser Methodik nicht festgestellt werden.

3.5.2 REINIGUNG VON FLIH, FLII UND FLIJ

Nach der Expression von *fliH*, *fliI* und *fliJ* sollte die individuelle Reinigung der synthetisierten Proteine aus dem *E. coli*-Zellextrakt zunächst durch Affinitätschromatographie erfolgen. Danach folgten teilweise noch weitere chromatographische Verfahren. FliH und FliJ konnten über den Strep-tag II mittels Strep-Tactin-Sepharose und über den 6 x His-tag mittels Ni-NTA-Agarose stark angereichert werden. Stammten die Proteine aus dem Vektor pASK-IBA 45 und hatten sowohl einen 6 x His-tag als auch einen Strep-tag II, wurden sie über die beiden entsprechenden Säulen geleitet. Die Abbildung 3.11 zeigt in Spur 1 FliH nach der Reinigung über die Strep-Tactin-Säule und in Spur 2 nach der weiteren Reinigung über die Ni-NTA-Säule. FliJ wurde zunächst über die Ni-NTA-Säule (Spur 4) und dann weiter über die Strep-Tactin-Säule (Spur 5) präpariert. Beide Proteine erreichten dadurch einen Reinheitsgrad von ca. 90 % mit Konzentrationen von ca. 1 mg Protein/ml. Die Ausbeute betrug damit für beide Proteine etwa 500 µg/l Zellkultur. Zweimal mittels Affinitätschromatographie gereinigtes FliH und FliJ wurden konzentriert bei der isothermalen Titrationskalorimetrie (Kapitel 3.5.6) eingesetzt.

Für den Einsatz bei der Surface Plasmon Resonance (Kapitel 3.5.7) wurde FliH mit nur einem „tag“ verwendet und zunächst nur über die Ni-NTA-Säule gereinigt. Danach wurde das FliH-Eluat noch weiter über die Gelfiltrationssäule präpariert. Dabei wurde die FliH-Probe stark verdünnt und nur wenige verhältnismäßig höher- und niedermolekulare Proteine wurden entfernt. Der Reinheitsgrad von FliH betrug nach der Gelfiltration ca. 50 %. Auch bei Anwendung der Anionenaustauschchromatographie anstatt der Gelfiltration erfolgte eine Verdünnung der Probe und der Proteinanteil von FliH betrug ebenfalls ca. 50 %.

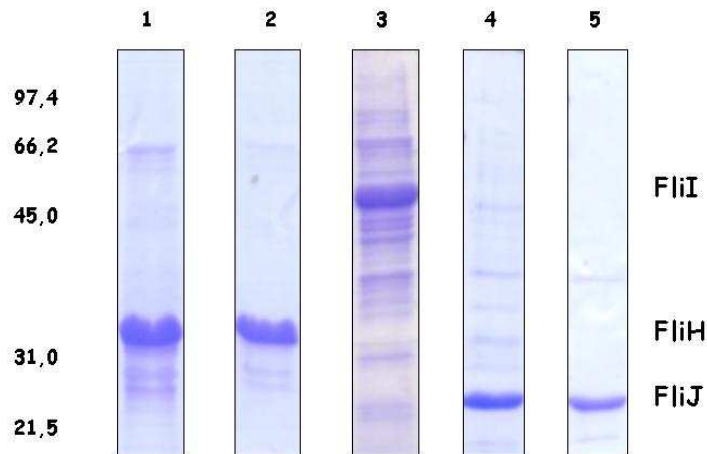


ABBILDUNG 3.11:

Coomassie gefärbte SDS-Gele mit gereinigtem FliH, FliI und FliJ aus dem Zellextrakt von *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA 45 bei FliH und FliJ bzw. pASK-IBA 3 bei FliI.

Links ist das Molekulargewicht in kDa angegeben. Die Spuren 1 und 2 zeigen FliH nach der Affinitätschromatographie über die Strep-Tactin- und dann folgend über die Ni-NTA-Säule. Die gelelektrophoretische Auftrennung von FliI in Spur 3 erfolgte nach der Affinitätschromatographie über die Strep-Tactin-Säule. FliJ wurde zunächst mittels Ni-NTA- (Spur 4) und dann anschließend mit Hilfe der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (Spur 5) gereinigt.

Für FliI war keine Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose möglich, weder mit einem 6 x His-tag noch mit einem 12 x His-tag. Eine Anreicherung von FliI zu ca. 50 % Proteinanteil war jedoch mit Hilfe der Strep-Tactin-Sepharose möglich (Spur 3, Abbildung 3.11). Die Gesamtproteinkonzentration betrug dabei ca. 500 µg/ml und die Ausbeute an FliI etwa 250 µg/l Zellkultur. Weitere Reinigungen des FliI-Eluats wurden über die Anionenaustauschchromatographie oder durch Gelfiltration durchgeführt. Die FliI-Probe wurde dabei jeweils stark verdünnt und war noch immer mit anderen Proteinen zu 50 % kontaminiert. Nach der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie mit folgender Gelfiltration wurde FliI für die Surface Plasmon Resonance eingesetzt, da bei dem gewählten Verfahren nur Proteine mit einem Strep-tag II immobilisiert werden konnten.

Wurden die Proteine durch zwei verschiedene Methoden gereinigt oder für die Pufferbedingungen bei den Interaktionsstudien eingestellt, machte dies eine Dialyse oder Konzentrierung der Proteinlösung notwendig. Bei der Dialyse wurde meistens ein Teil des

Proteins gefällt, was zu einem Verlust an Protein führte. Auch bei der oft nötigen Konzentrierung der Proteine über Filtriersysteme ging Protein verloren.

Bei der Proteinreinigung war das Verfahren über zwei Säulen mittels Affinitätschromatographie schließlich der effektivste Weg, Proteine möglichst rein und durch ein gewähltes geringes Elutionsvolumen auch möglichst konzentriert zu erhalten. Zu diesem Zweck waren jedoch zwei „tags“ am jeweiligen Protein nötig, die gemäß den Erfahrungen aus den Komplementationsstudien (Kapitel 3.4), die Aktivität des Proteins stören konnten. Als zweiter Reinigungsschritt wurde deswegen oft die Gelfiltration gewählt.

3.5.3 OLIGOMERISIERUNG VON FLIH BZW. FLII

Bei der individuellen Reinigung der Proteine FliH und FliI mittels Gelfiltration konnte eine Homooligomerisierung bei beiden Proteinen beobachtet werden. Damit erfolgte der Einsatz der Gelfiltration auch zu analytischen Zwecken. Vor der Gelfiltration wurden FliH bzw. FliI jeweils über die Strep-Tactin-Sepharosesäule vorgereinigt. Die dabei gewählten Pufferbedingungen wurden bei der Gelfiltration beibehalten. Abbildung 3.12 zeigt die einzelnen Elutionsprofile von FliH und FliI während der Gelfiltration über die „HiLoad 16/60 Superdex 200“-Säule im Vergleich. Zur Beurteilung der Proteingrößen sind die Molekulargewichte ausgewählter Eichproteine bei dem entsprechenden Elutionsbereich angegeben. Eluatfraktionen von FliH bzw. FliI mit hohem Proteinanteil wurden nach der Messung der Extinktion bei 280 nm zur Überprüfung des Molekulargewichts des jeweils monomeren Proteins in einem SDS-Gel aufgetrennt und dann mit Coomassie gefärbt.

Es konnte gezeigt werden, dass FliH und auch FliI zum größten Teil in einem höher oligomerisierten Zustand von der Gelfiltrationssäule eluiert wurden (erste Peaks der Elutionsprofile bei einem Volumen von ca. 60 ml in Abbildung 3.12). Ein geringerer Teil von FliH wurde als Dimer und von FliI als Monomer von der Gelfiltrationssäule entlassen (jeweils zweiter Peak bei ca. 100 ml). FliI mit einem theoretischen Molekulargewicht von 49 316 Da wurde im Vergleich mit den Eichproteinen bei einem Molekulargewicht von ca. 600 000 Da eluiert, was der Größe eines Dodecamers entspricht. Da FliH bei etwa dem gleichen Volumen von der Säule kam und mit 25 050 Da halb so groß wie FliI ist, lag hier vermutlich ein Homooligomer bestehend aus 24 FliH-Monomeren vor.

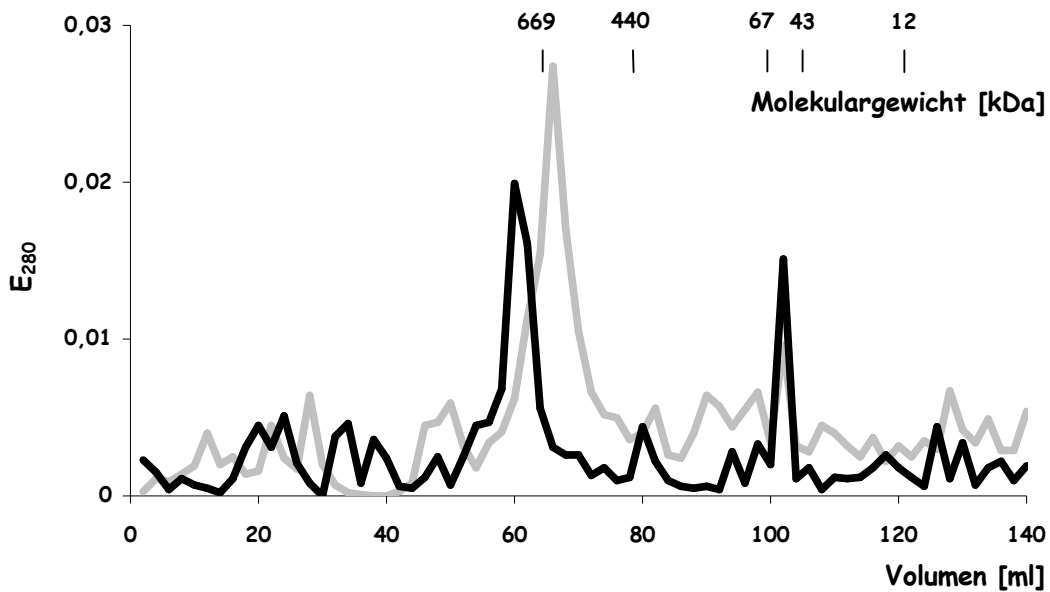


ABBILDUNG 3.12:

Elutionsprofile von FliH und FliI nach der jeweiligen Gelfiltration über die „HiLoad 16/60 Superdex 200“-Säule.

Eine erhöhte FliH- (grau) bzw. FliI-Konzentration (schwarz) war in den Eluatfraktionen bei ca. 600 kDa vorhanden. Demnach bestand der Proteinkomplex bei FliH aus 24 Monomeren und bei FliI aus 12 Monomeren. Ein weiterer Peak folgt in beiden Elutionsprofilen bei ca. 50 kDa für das FliI-Monomer bzw. das FliH-Dimer. Als Molekulargewichtsstandards wurden Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Cytochrom c (12 kDa) verwendet.

FliI konnte in einem Coomassie gefärbten SDS-Gel sowohl aus der Monomerkfraktion als auch aus der Dodecamerfraktion nachgewiesen werden. Die Detektion von FliH in einem Coomassie-Gel erfolgte nur aus der Fraktion mit dem höher oligomerisierten Zustand und nicht aus der Dimerfraktion (ohne Abbildung). Das Oligomerisierungsverhalten von FliH bzw. FliI wurde auch mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese mit folgendem Immunoblot untersucht. FliI konnte bei diesem Verfahren nicht über den vorhandenen Strep-tag II detektiert werden. FliH, ebenfalls mit einem Strep-tag II versehen, ließ sich dagegen in vielen Oligomerisationszuständen vom Tetramer aufwärts im nativen Gel nachweisen (ohne Abbildung).

3.5.4 ATPASE-AKTIVITÄT VON FLiI

Die Aktivität der flagellumspezifischen ATPase Fl*I*I wurde für das Dodecamer und für das Monomer nach der Reinigung mittels Gelfiltration bestimmt. Das in der Monomerfraktion enthaltene Fl*I*I war nicht aktiv. Die Aktivität für das Fl*I*I-Dodecamer betrug zwischen $36 \text{ nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei eingesetzten $0,16 \mu\text{g}$ Fl*I*I und $4196 \text{ nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei eingesetzten $1,6 \mu\text{g}$ Fl*I*I. In Abbildung 3.13 ist die ATPase-Aktivität von Fl*I*I aus der Dodecamerfraktion in Abhängigkeit von der Fl*I*I-Menge in μg dargestellt. Da das Volumen je Ansatz gleich blieb, nahm mit der Fl*I*I-Menge die Fl*I*I-Konzentration zu. Durch höhere Fl*I*I-Konzentrationen wurde schließlich die ATPase-Aktivität stimuliert.

Zur Kontrolle wurde auch der ATPase-Test mit den Proteinen Fl*I*H und Fl*I*J durchgeführt. Beide Proteine zeigten keine Aktivität. Zudem hatte eine Zugabe von Fl*I*H oder Fl*I*J zum Fl*I*I-Dodecamer, jeweils im molaren Verhältnis von 2:1, keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von Fl*I*I. Es war weder eine Hemmung noch eine Stimulation des Fl*I*I-Dodecamers durch Fl*I*H oder Fl*I*J zu messen.

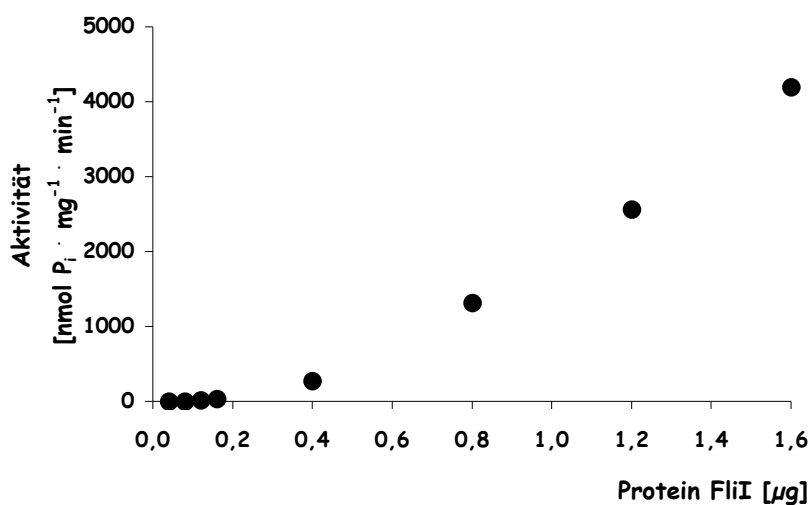


ABBILDUNG 3.13:
ATPase-Aktivität
von Fl*I*I.

Die Aktivität ist in $\text{nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in Abhängigkeit von der Fl*I*I-Menge in μg dargestellt.

3.5.5 INTERAKTIONSANALYSE MITTELS AFFINITÄTSBLOT

Beim Affinitätsblot sollten die Komponenten nach dem Westernblot des ersten Proteins mit dem zweiten Protein, welches dann mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen wurde, inkubiert werden. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden entweder lysierte *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen oder bereits gereinigtes Protein verwendet. Bei den in ganzen Zellen synthetisierten oder bereits präparierten Proteinen handelte es sich um Fl*I*H,

FliI und FliJ. Das geblottete Protein war dabei mit einem C-terminalen 6 x His-tag versehen und das Inkubationsprotein mit einem C-terminalen Strep-tag II oder umgekehrt. Bei der Durchführung dieser Affinitätsblots konnten keine eindeutigen Interaktionen zwischen den Proteinen ermittelt werden. Schwache Signale gab es für eine Interaktion zwischen geblottetem FliH oder FliJ mit jeweils C-terminalen Strep-tag II aus lysierten Zellen und dem Nachweis des gereinigten Inkubationsproteins FliH über dessen C-terminalen 6 x His-tag. Diese Ergebnisse sprechen für eine FliH-Dimerisierung und eine FliH-FliJ-Interaktion. Es wurde jedoch auch ersichtlich, dass die Interaktionen mit endogenen, also nicht überproduzierten Proteinen, erfolgen konnten. Abbildung 3.14 zeigt die Westernblotanalyse genau dieser Interaktionen.

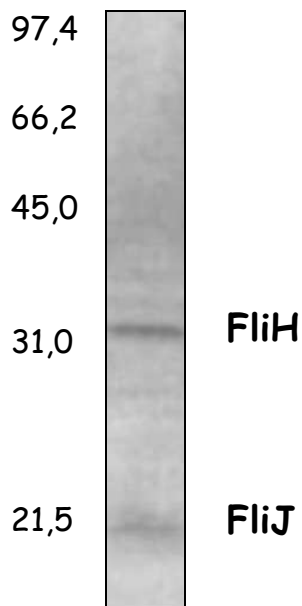


ABBILDUNG 3.14:

Affinitätsblot von *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen und gereinigtem FliH mit C-terminalem 6 x His-tag.

20 µl mit Probenpuffer lysierte Zellen ($OD_{420\text{ nm}} = 36$) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde zunächst mit 10 ml Proteinlösung (50 µg FliH-6 x His/ml TBS-Puffer) und dann mit dem Antikörper gegen den 6 x His-tag inkubiert.

3.5.6 INTERAKTIONSANALYSE MITTELS ISOTHERMALER TITRATIONS-KALORIMETRIE

Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie wurde die Interaktion zwischen FliJ und FliH bei einer Temperatur T von 37 °C (310 Kelvin) und einem pH-Wert von 8,0 untersucht. Dabei wurden 200 µM FliH zu 20 µM FliJ in eine Probenzelle titriert. Nach Abzug der Verdünnungswärme durch den verwendeten Puffer konnte die entstandene Wärmeenergie der FliJ-FliH-Interaktion bestimmt werden. Abbildung 3.15 zeigt die Energiefreisetzung in der Probenzelle im Verlauf der Titration (Injektion 1 bis 14) in einer sigmoiden Kurve.

Für die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A der FliJ-FliH-Interaktion konnte ein Wert von $1,31 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Dieser K_A -Wert deutet auf eine schwache Bindung zwischen FliJ und FliH hin und mit ihm konnten weitere thermodynamische Parameter für die FliJ-FliH-Interaktion berechnet werden. Für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ergab sich ein Wert von $7,63 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, da $K_D = K_A^{-1}$.

Im Gleichgewichtszustand ist dann die freie Energie der der FliJ-FliH-Interaktion: $\Delta G = -RT \cdot \ln K_D$, mit $R = 8,32 \text{ J} \cdot \text{Kelvin}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, also $\Delta G = -8,32 \text{ J} \cdot \text{Kelvin}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 310 \text{ Kelvin} \cdot \ln 1,31 \cdot 10^6 = -36,33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Die Enthalpie oder Bindungsenergie ΔH hatte einen Wert von $-7,53 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Bei der Bindung von FliJ und FliH lief dementsprechend eine exotherme Reaktion ab. Für die Stöchiometrie N wurde ein Wert von 0,32 n ermittelt, das heißt das molare Verhältnis von FliJ zu FliH beträgt nach diesen Messergebnissen 1:3.

Mit Hilfe der Gleichung $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ konnte schließlich noch eine geringe Zunahme der Entropie ΔS berechnet werden:

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) \cdot T^{-1} = (-7,53 + 36,33) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot (310 \text{ K})^{-1} = 0,09 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}.$$

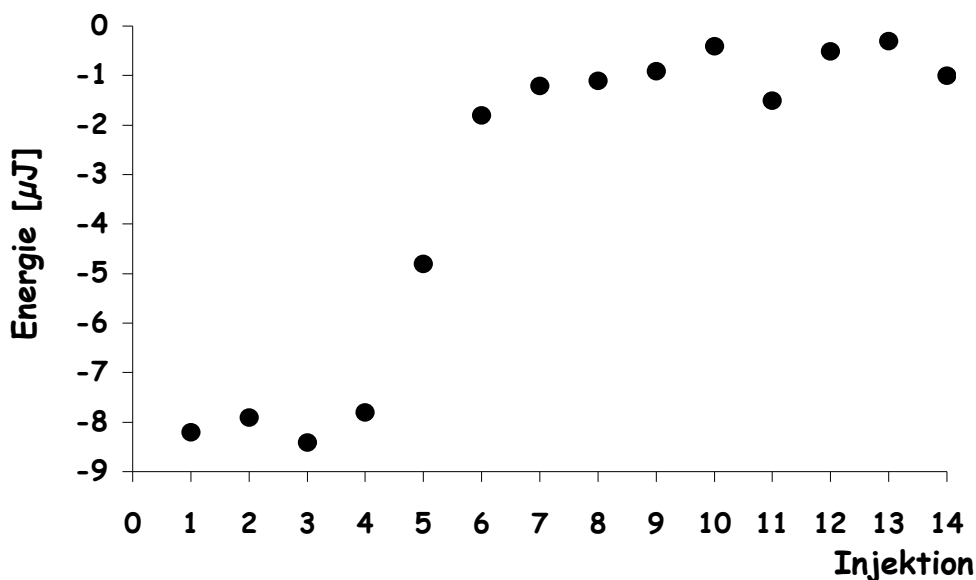


ABBILDUNG 3.15:

FliJ-FliH-Interaktion ermittelt durch isothermale Titrationskalorimetrie.

Freigesetzte Energie in µJ bei der Titration von 14 mal 7 µl 200 µM FliH zu 1 ml 20 µM FliJ bei 37 °C und pH 8,0 nach Abzug der entstandenen Verdünnungswärme durch den verwendeten Puffer.

3.5.7 INTERAKTIONSANALYSE MITTELS SURFACE PLASMON RESONANCE

Bei der Surface Plasmon Resonance wurden die Interaktionen zwischen FliI und FliH sowie FliI und FliJ untersucht. FliI war dafür mit Hilfe des C-terminalen Strep-tag II über Strep-Tactin auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Der Immobilisierungslevel von FliI betrug dabei ca. 1000 RU also ca. 1 ng/mm². FliH bzw. FliJ wurden dann jeweils dazu injiziert und die Interaktionen konnten in Echtzeit verfolgt und aufgezeichnet werden.

Abbildung 3.16 zeigt die Bindung von FliH an FliI. Für FliH wurden hier Konzentrationen zwischen 3 (unterer Graph) und 30 µM (oberer Graph) eingesetzt. Der erste Bereich des Sensorgramms von 0 bis 80 s zeigt die Assoziation der Proteine FliI und FliH. Dabei wurden bei 3 µM FliH ca. 40 RU, bei 6 µM ca. 70 RU, 12 µM ca. 120 RU und bei 30 µM ca. 160 RU erreicht. Nach Erreichen des Gleichgewichts und Ende der FliH-Zugabe kam es zur Dissoziation der beiden Proteine. Diese bestand aus einer Phase mit stärkerer Dissoziation im Bereich von 80 bis 150 s und einer zweiten Phase schwächerer Dissoziation ab 150 s. Der Verlauf der Interaktion zwischen FliI und FliJ ist in Abbildung 3.17 graphisch dargestellt. Die eingesetzten FliJ-Konzentrationen lagen dabei zwischen 5 (unterer Graph) und 50 µM (oberer Graph). Während der Assoziation wurden bei Zugabe von 5 µM FliJ ca. 80 RU, von 10 µM ca. 100 RU, von 20 µM ca. 125 RU und von 50 µM ca. 175 RU erreicht. Auch hier kam es nach Erreichen des Gleichgewichts und Ende der FliJ-Zugabe zur Dissoziation der beteiligten Proteine.

ABBILDUNG 3.16:
FliI-FliH-Interaktion
ermittelt durch Surface
Plasmon Resonance.

Sensorgramme der Bindung von FliH an FliI. FliI war über den Strep-tag II und Strep-Tactin auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. 40 µl FliH in HBS-EP-Puffer wurde in Konzentrationen von 30, 12, 6 und 3 µM (von oben nach unten) bei einer Flussrate von 30 µl/min und einer Temperatur von 25 °C dazu injiziert.

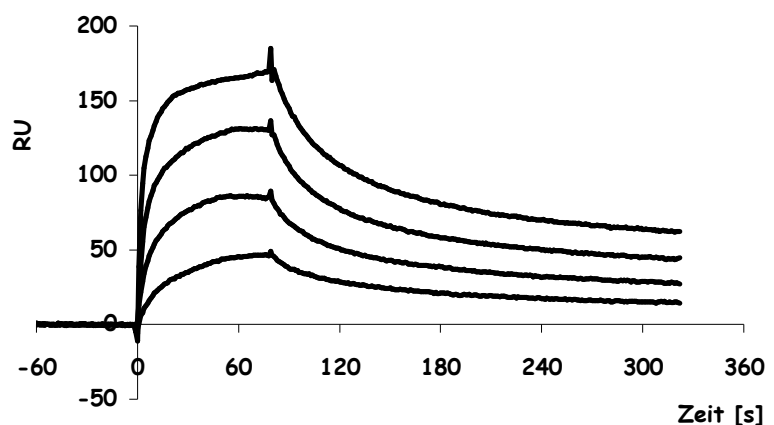
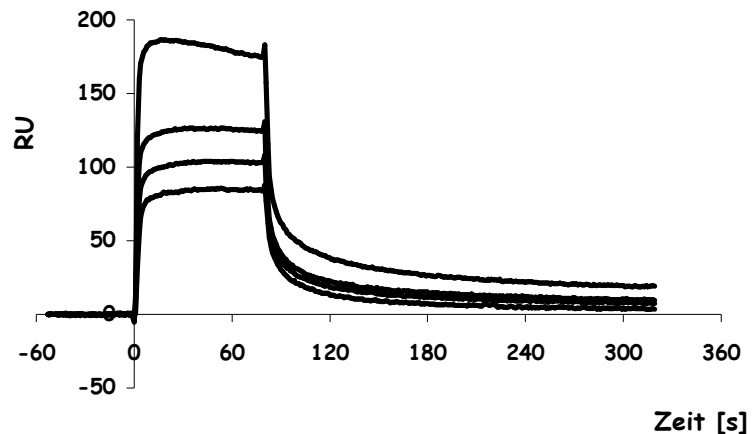


ABBILDUNG 3.17:
FliI-FliJ-Interaktion
ermittelt durch Surface
Plasmon Resonance.

Sensorgramme der Bindung von FliJ an FliI. FliI war über den Strep-tag II und Strep-Tactin auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. 40 µl FliJ in HBS-EP-Puffer wurde in Konzentrationen von 50, 20, 10 und 5 µM (von oben nach unten) bei einer Flussrate von 30 µl/min und einer Temperatur von 25 °C dazu injiziert.



Im Vergleich der beiden verschiedenen Interaktionspartner FliH und FliJ konnte FliI nach der FliJ-Interaktion schneller regeneriert werden als nach der Interaktion mit FliH. D. h. FliI konnte von FliJ schneller und effizienter als von FliH befreit werden. Die FliI-FliH-Bindung war mit den verschiedensten Regenerationspuffern nur schwer zu lösen. Dies ist ein Hinweis auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen FliI und FliJ einerseits und FliI und FliH andererseits. Da vermutlich hydrophobe Bindungen schwer mit den Regenerationspuffern zu lösen waren, beruhte die FliI-FliH-Interaktion vielleicht auf eher hydrophoben Wechselwirkungen als die FliI-FliJ-Interaktion.

Mit Hilfe der „BIAevaluation Software“ (BIAcore) konnten die experimentell ermittelten Kurven verschiedener Messreihen mathematischen Graphen unter Anwendung verschiedener Modelle angepasst und dabei sowohl Geschwindigkeits- als auch Gleichgewichtskonstanten berechnet werden. Die für die FliI-FliH- und FliI-FliJ-Interaktionen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation k_a und Dissoziation k_d sowie die Gleichgewichtskonstanten für die Assoziation K_A und Dissoziation K_D sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Für beide Interaktionen wurde das Langmuir-1:1-Bindemodell für die simultane k_a/k_d -Bestimmung der „BIAevaluation Software“ angewendet. Bei diesem Modell wird von Monolagen sowohl von Ligand als auch vom Analyten ausgegangen. Die Langmuir-Gleichung setzt dabei die Menge des im Gleichgewichtszustand gebundenen Analyten (A) im Verhältnis zur Menge an Analyt die maximal gebunden werden kann (A_{max}) unter Berücksichtigung der Analytkonzentration (c_A) und der Gleichgewichtskonstante (K_A): $A = A_{max} \cdot c_A \cdot (1 + K_A \cdot c_A)^{-1}$

Da bei der FliI-FliH-Interaktion die gemessenen Werte besser an das Modell „heterogeneous ligand – parallel reactions“ angepasst werden konnten, wurden Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten auch nach diesem Modell bestimmt, wobei sich aufgrund der Parallelreaktion jeweils zwei Werte berechnen ließen. Die Bestimmung von zwei Affinitäten für die FliI-FliH-Interaktion ist eine Bestätigung der oben beschriebenen zweiphasigen Dissoziation von FliI und FliH. Sowohl für die FliI-FliH- als auch für die FliI-FliJ-Bindung wurden zudem die Werte für K_A und K_D auch mit Hilfe der „steady state“-Affinität ermittelt. Die hohen Standardabweichungen liegen bei ca. 50 %. Sie sind vermutlich auf die Möglichkeit der Schädigung von FliI durch die langwierigen Regenerationen nach den einzelnen Messungen oder den geringen Reinheitsgrad von nur ca. 50 % von FliI zurückzuführen.

TABELLE 3.1:

Kinetik-Parameter der FliI-FliH- und FliI-FliJ-Interaktionen ermittelt durch Surface Plasmon Resonance.

(A = simultane k_a/k_d -Bestimmung anhand des Langmuir-1:1-Bindemodells, B = simultane k_a/k_d -Bestimmung nach dem Modell „heterogeneous ligand – parallel reactions“, C = „steady state“-Affinität, (+/-) = Standardabweichung mit $n = 3$ bei FliH und $n = 2$ bei FliJ)

FliI-Interaktionspartner	Methode / Modell	k_a [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_A [M^{-1}]	K_D [M]
FliH	A	$1,72 \cdot 10^3$ (+/- $0,81 \cdot 10^3$)	$2,73 \cdot 10^{-3}$ (+/- $1,04 \cdot 10^{-3}$)	$6,62 \cdot 10^5$ (+/- $2,74 \cdot 10^5$)	$1,72 \cdot 10^{-6}$ (+/- $0,78 \cdot 10^{-6}$)
FliH	B	$1,03 \cdot 10^4$ (+/- $0,81 \cdot 10^4$)	$1,87 \cdot 10^{-2}$ (+/- $1,54 \cdot 10^{-2}$)	$7,39 \cdot 10^5$ (+/- $3,40 \cdot 10^5$)	$1,52 \cdot 10^{-6}$ (+/- $0,56 \cdot 10^{-6}$)
		$2,89 \cdot 10^3$ (+/- $3,16 \cdot 10^3$)	$7,06 \cdot 10^{-3}$ (+/- $9,90 \cdot 10^{-3}$)	$6,48 \cdot 10^5$ (+/- $2,55 \cdot 10^5$)	$1,78 \cdot 10^{-6}$ (+/- $0,91 \cdot 10^{-6}$)
FliH	C			$1,12 \cdot 10^5$ (+/- $0,17 \cdot 10^5$)	$9,04 \cdot 10^{-6}$ (+/- $1,26 \cdot 10^{-6}$)
FliJ	A	$3,68 \cdot 10^3$ (+/- $1,66 \cdot 10^3$)	$1,12 \cdot 10^{-2}$ (+/- $0,31 \cdot 10^{-2}$)	$3,61 \cdot 10^5$ (+/- $2,47 \cdot 10^5$)	$3,63 \cdot 10^{-6}$ (+/- $2,48 \cdot 10^{-6}$)
FliJ	C			$1,86 \cdot 10^5$ (+/- $0,98 \cdot 10^5$)	$6,29 \cdot 10^{-6}$ (+/- $3,35 \cdot 10^{-6}$)

Da es sich bei FliI um die flagellumspezifische ATPase handelt, wurde die Bindung von FliH bzw. FliJ auch zusammen mit 2 mM ATP und 2 mM $MgCl_2$ untersucht (Abbildung 3.18). Was FliH betrifft, wurden dabei zunächst 15 % mehr FliH an FliI gebunden, denn es wurden ca. 115 anstatt ca. 100 RU erreicht. Die Dissoziation erfolgte jedoch fast identisch im Vergleich der beiden Kurven. Auch wurde FliH nur mit ATP ohne $MgCl_2$ zur Kontrolle injiziert, was jedoch der Kurve von FliH allein entsprach (ohne Abbildung). Es war dadurch keine vermehrte FliH-Bindung zu messen. Im Falle von FliJ wurde bei Zugaben von ATP und $MgCl_2$ ein um ca. 30 RU bzw. 33 % erhöhtes Signal

gemessen, denn es wurden ca. 90 anstatt ca. 60 RU erreicht (Abbildung 3.18). Bei der Injektion von FliJ mit ATP ohne MgCl_2 fiel die Bindung jedoch geringer aus als bei der Zugabe von FliJ allein (ohne Abbildung).

Wurden FliH und FliJ zusammen vorinkubiert und dann zu FliI injiziert, ergab sich eine Bindekurve in Form der FliH-Bindung allein jedoch mit einer größeren Resonanz (ohne Abbildung). FliH hat dabei vermutlich an FliI gebunden und FliJ war über FliH mit dem FliI-FliH-Komplex vereint. Mit auf einem Sensorchip kovalent immobilisiertem FliJ, dem kleinsten der drei Proteine der löslichen Komponenten des flagellären Exportapparates, konnte nur eine leichte FliJ-FliJ-Interaktion und damit eine FliJ-Dimerisierung detektiert werden. Trug der Sensorchip über einen Antikörper gebundenes FliH, konnten keine Interaktionen mit FliI oder FliJ detektiert werden.

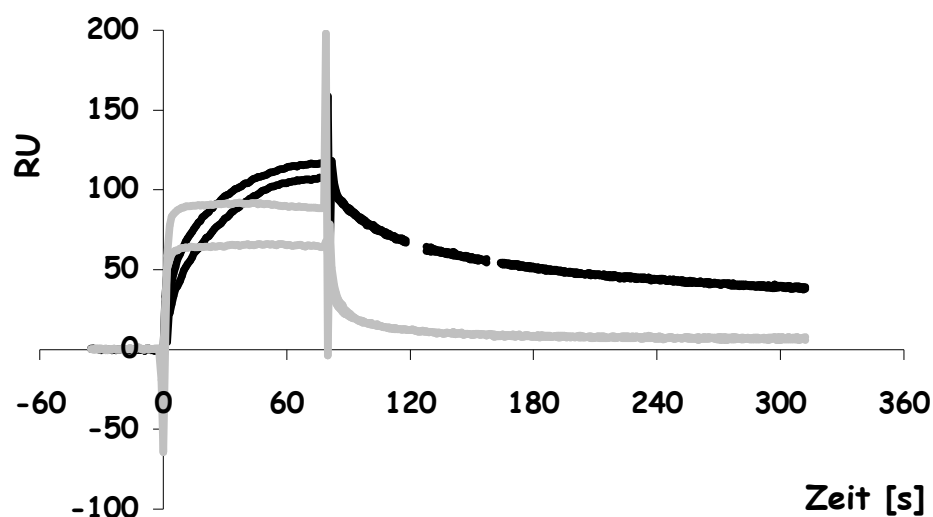


ABBILDUNG 3.18:

FliI-FliH- und FliI-FliJ-Interaktionen unter dem Einfluss von ATP ermittelt durch Surface Plasmon Resonance.

Sensorgramme der Bindung von FliH (schwarz) bzw. FliJ (grau) an FliI. FliI war über den Strep-tag II und Strep-Tactin auf einem CM5-Sensorchip (BIAcore) immobilisiert. Es wurden jeweils 40 μl Probe in HBS-EP-Puffer bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ dazu injiziert: 5 μM FliH mit 2 mM ATP und 2 mM MgCl_2 (schwarz, oben), 5 μM FliH (schwarz, unten), 10 μM FliJ mit 2 mM ATP und 2 mM MgCl_2 (grau, oben) und 10 μM FliJ (grau, unten).

Die Untersuchungen zu den Interaktionen haben zusammenfassend bei der Co-Reinigung die Zusammengehörigkeit des postulierten FliHIJ-Komplexes bestätigt. Interaktionen zwischen einer oder mehreren Komponenten dieses Komplexes mit einem der beiden Substrate FlgD oder FlgE konnten nicht gezeigt werden. Gemäß den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration oligomerisieren die einzelnen Komponenten FliI und FliH. FliI wurde als Dodecamer eluiert und FliH erreicht vermutlich ein Oligomer aus 24 FliH-Monomeren. Beim ATPase-Test konnte dann auch nur beim FliI-Dodecamer und nicht in der FliI-Monomerfraktion eine Aktivität festgestellt werden. Mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie konnten schließlich die thermodynamischen Parameter einer FliH-FliJ-Interaktion bestimmt werden. Die Surface Plasmon Resonance lieferte anschließend kinetische Parameter für FliI-FliH- und FliI-FliJ-Bindungen.

3.6 CHARAKTERISIERUNG DES TYP III-EXPORTSIGNALS

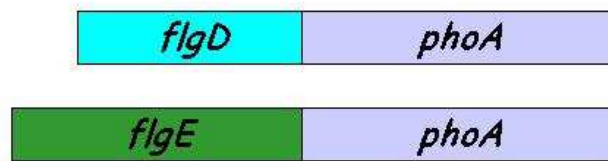
Ein weiterer Teil dieser Arbeit sollte sich der Charakterisierung des Typ III-Exportsignals widmen. Dafür wurde zunächst das Hakenkappenprotein FlgD als Substrat gewählt (Kapitel 3.6.1 bis 3.6.4). Später wurden auch Untersuchungen mit dem Hakenprotein FlgE begonnen (Kapitel 3.6.5). Was FlgD betrifft, wurde zunächst die *flgDphoA*-Fusion im Vektor pT7-5 hergestellt und die *E. coli*-Stämme MO1 und MO2 aus CC181 für die Exporttests (Kapitel 3.6.1) generiert. Für die Bestimmung der Lage des Exportsignals wurde *flgD* danach vom 5'- oder vom 3'-Ende her stufenweise verkürzt und ebenfalls mit *phoA* fusioniert (Kapitel 3.6.2). Am 5'-Ende wurden des Weiteren Rasterschubmutationen oder stille Mutationen eingefügt. Auch die Wirkung einer N-terminalen amphipathischen Sequenz wurde überprüft (Kapitel 3.6.3).

Die hier dargestellten Arbeiten wurden von Corinna Weber-Sparenberg (Dissertation), Maike Rochón (Diplomarbeit 2001) und Heiner Brookman (Forschungspraktikum 2002) begonnen und von mir im Rahmen dieser Dissertation fortgesetzt. Mein Anteil daran waren die Wiederholung von Plattentests für die Blau/Weiß-Selektion sowie die Durchführung von Westernblotanalysen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 3.2 bis 3.5 mit einem Stern gekennzeichnet. Auch die Untersuchungen zur Rolle von Methionin 52 in FlgD (Kapitel 3.6.4), zum Exportverhalten von FlgE (Kapitel 3.6.5) und zur möglichen Lyse von *E. coli*-Zellen bei der Präparation der periplasmatischen Fraktion durch Bestimmung der Isocitratdehydrogenaseaktivität (Kapitel 3.6.1) sind im Rahmen dieser Dissertation von mir durchgeführt worden.

3.6.1 FUNKTIONSWEISE DES EXPORTS DER FLGDPhoA-HYBRIDPROTEINE INS PERIPLASMA

Für die Exporttests wurde der *E. coli*-Stamm CC181 gewählt. Dieser trug eine *phoA*-Deletion, so dass die endogene Alkalische Phosphatase in dem Stamm nicht mehr synthetisiert werden und falsch-positive Signale geben konnte. Die FlgDPhoA-Hybridproteine wurden bei CC181 in die Umgebung der *E. coli*-Zelle sekretiert. MO2 war gegenüber CC181 zusätzlich in *flgB-D* deletiert. Hier fehlten der Flagellenstab und das Hakenkappenprotein. Der Substratexport erfolgte hier ins Periplasma der Zellen (Abbildung 3.19). Im Periplasma war die Alkalische Phosphatase des FlgDPhoA-Hybridproteins mit FlgD in seiner gesamten Länge (1-231) aktiv und konnte nachgewiesen werden. Erfolgte kein Transport, war dies von der Beschaffenheit des Substrats abhängig und ein Hinweis für den Charakter des Erkennungssignals. MO1 hatte schließlich im Vergleich zu CC181 eine Deletion bezüglich *flhA*, einer Membrankomponente des flagellären Exportapparates. In diesem Stamm konnte kein Substrattransport erfolgen, und somit war dieser Stamm eine Negativkontrolle bei den durchgeführten Versuchen (Abbildung 3.19). Eine weitere Negativkontrolle für den Export war die Generation von PhoA allein ohne Sequenzbereiche von FlgD im Stamm MO2. Dabei konnte die Alkalische Phosphatase nicht ins Periplasma gelangen, weil deren eigene Führungssequenz hier sowie in allen Hybridproteinen eliminiert wurde, und damit weder aktiviert noch dort detektiert werden. Zur Untersuchung des Exports der FlgDPhoA-Hybridproteine wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Die Alkalische Phosphatase konnte bei Westernblotanalysen mittels eines Antikörpers in ganzen Zellen, im Periplasma oder im Überstand detektiert werden. Auch konnte ihre enzymatische Aktivität im Periplasma über die *p*NPP-Hydrolyse gemessen und in Miller units U angegeben werden. Eine grobe Einschätzung für den Erfolg des Exports wurde zunächst mit Hilfe der Blau/Weiß-Selektion in Form eines Plattentests durchgeführt. Bei Erfolg des Exports der Alkalischen Phosphatase ins Periplasma färbten sich die Zellkolonien auf der Platte blau. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse für die Etablierung des FlgDPhoA-Export-Testsystems zusammengefasst.

Modellsubstrate in pT7-5:



Stämme:

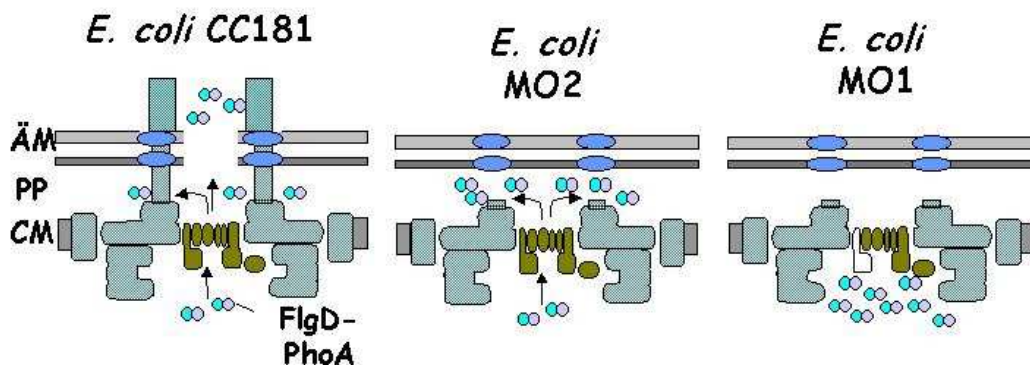


ABBILDUNG 3.19:

Funktionsweise des FlgDPhoA-Exports ins Periplasma.

Die Modellsubstrate FlgD (Hakenkappe) und FlgE (Haken), jeweils als Hybridprotein mit der Alkalischen Phosphatase, konnten im *E. coli*-Stamm CC181 mit Hilfe des flagellären Exportapparates (olivgrün) durch den Stab des Flagellums nach draußen transportiert werden. Dem *E. coli*-Stamm MO2 fehlte durch die Deletion *flgB-D* der Stab des Flagellums und der Transport der Substrate erfolgte ins Periplasma (PP), wo PhoA als Dimer aktiv und nachweisbar war. Bei MO1 war die Komponente *flhA* des Exportapparates deletiert, die Modellsubstrate verblieben im Cytoplasma (ÄM = äußere Membran, CM = Cytoplasmamembran).

TABELLE 3.2:

FlgDPhoA-Export ins Periplasma bei verschiedenen *E. coli*-Stämmen.

Der Nachweis von FlgDPhoA im Periplasma erfolgte mittels Blau/Weiß-Selektion, Ermittlung der PhoA-Aktivität und durch Westernblotanalyse (PP = Periplasma, Ü = Überstand, Z = lysierte Zellen, + = PhoA-Nachweis, ++ = PhoA-Nachweis mit starker Bande, (+) = PhoA-Nachweis mit schwacher Bande, - = kein PhoA-Nachweis, * = im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt).

<i>E. coli</i> -Stamm	Koloniefarbe bei der Blau/Weiß-Selektion	PhoA-Aktivität in Miller units [U]	Immunologischer Nachweis beim Westernblot		
			PP	Ü	Z
CC181 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	blau*	38	++	+	+
MO1 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	weiß*	27	-	-	+
MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	blau*	95	++	+	+
MO2 pT7-5 <i>phoA</i>	weiß*	27	-	-	(+)

Die Einsetzbarkeit des etablierten Testsystems für die Westernblotanalysen der periplasmatischen Fraktion wurde mit Hilfe eines Enzymtests überprüft. Dabei wurde die Aktivität der Isocitratdehydrogenase zur Kontrolle vom Zellextrakt und der periplasmatischen Fraktion verschiedener *E. coli* MO2-Stämme untersucht. Da die Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase in der periplasmatischen Fraktion dieser Zellen nur 5 % im Vergleich zum Zellextrakt betrug, konnte eine komplette Lyse der Zellen bei der Präparation der periplasmatischen Fraktion ausgeschlossen werden. Die FlgDPhoA-Hybridproteine wurden mit Hilfe des Exportapparates ins Periplasma transportiert.

Abbildung 3.20 zeigt als Beispiel die Zunahme an NADPH im Reaktionsansatz durch die Aktivität der Isocitratdehydrogenase im Zellextrakt und in der periplasmatischen Fraktion von MO2 pT7-5 1-231flgDphoA innerhalb der ersten 3 min nach dem Start der enzymatischen Reaktion. Die Messung erfolgte im linearen Bereich der Enzymkinetik. Anhand der Steigung konnte dann die Initialgeschwindigkeit der Isocitratdehydrogenase in $\mu\text{g NADPH je 1 ml Zellen mit einer OD}_{600\text{ nm}}$ von 2 pro min bestimmt werden: Dies waren $86 \mu\text{g NADPH} \cdot [\text{ml Zellen (OD}_{600\text{ nm}} = 2)]^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für den Zellextrakt und für die periplasmatische Fraktion von MO2 pT7-5 1-231flgDphoA nur $4 \mu\text{g NADPH} \cdot [\text{ml Zellen (OD}_{600\text{ nm}} = 2)]^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

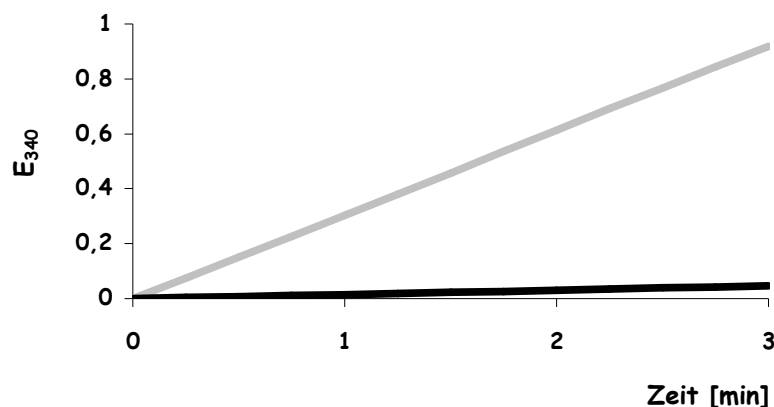


ABBILDUNG 3.20:

NADPH-Produktion durch die Isocitratdehydrogenase aus *E. coli* MO2.

Zunahme von $E_{340\text{ nm}}$ durch die Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase aus dem Periplasma (schwarz) und dem Zellextrakt (grau) von MO2 pT7-5 1-231flgDphoA während der ersten 3 min nach dem Start der Enzymreaktion.

Der Wert für den Zellextrakt wurde dann gleich 100 % gesetzt, so dass die Isocitratdehydrogenaseaktivität im Periplasma nur ca. 5 % im Vergleich betrug (Abbildung 3.21). Entsprechend gelangten auch andere cytosolische Proteine wie die FlgDPhoA-Hybridproteine höchstens zu 5 % ins Periplasma, der größte Teil an Hybridproteinen wurde ins Periplasma transportiert.

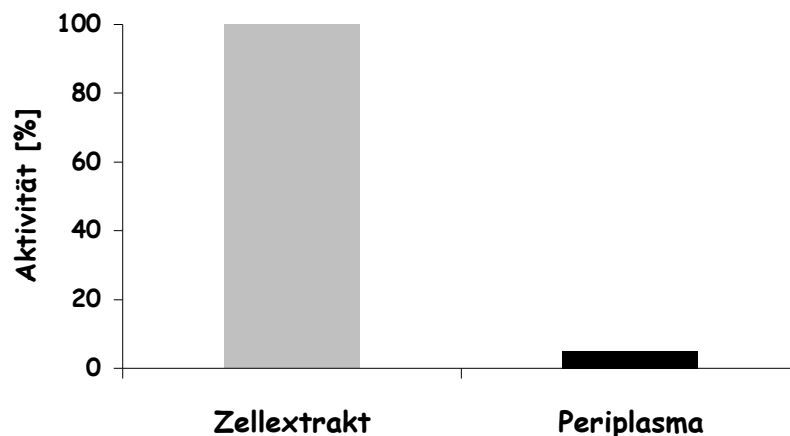


ABBILDUNG 3.21:

Aktivität der Isocitratdehydrogenase in Zellextrakt und Periplasma.

Die Enzymaktivität ist für den Zellextrakt des *E. coli*-Stamms MO2 pT7-5 1-231 *flgDphoA* als 100 % gesetzt. Die Enzymaktivität im Periplasma des gleichen Stamms entspricht im Vergleich ca. 5 % der Aktivität im Zellextrakt.

3.6.2 AUSWIRKUNGEN VON *FLGD*-VERKÜRZUNGEN AUF DEN *FLGDPHOA*-EXPORT

Zur Bestimmung der Minimalsequenz auf Nukleotid- oder Aminosäureebene, die für einen FlgDPhoA-Export ins Periplasma notwendig ist, wurden bei *flgD* Deletionen am 5'- oder 3'-Ende in unterschiedlichen Längen eingeführt. Was die N-terminalen Verkürzungen bei FlgD betrifft, konnte gezeigt werden, dass bereits bei Verkürzungen von 8 bis 31 Aminosäuren (AS) der FlgDPhoA-Transport ins Periplasma im Vergleich zu 1-231FlgDPhoA (FlgD in seiner gesamten Länge) drastisch reduziert war. Bei Verkürzungen von 68 bis 134 AS konnte dann kaum noch oder kein Transport mehr ins Periplasma erfolgen. So sind die Hybridproteine 9-231FlgDPhoA, 32-231FlgDPhoA und 68-231FlgDPhoA jeweils noch im Periplasma nachweisbar, 102-231FlgDPhoA und 134-231FlgDPhoA hingegen nicht mehr. Die Reduktion des FlgDPhoA-Exports wurde sowohl bei der Blau/Weiß-Selektion als auch bei der Bestimmung der PhoA-Aktivität und den Westernblotanalysen

ersichtlich. Dabei zeigte der Immunoblot von lysierten Zellen, dass alle Hybridproteine auch gebildet worden waren. In Tabelle 3.3 sind diese Untersuchungsergebnisse zusammen aufgeführt.

TABELLE 3.3:

Auswirkungen von N-terminalen *flgD*-Verkürzungen auf den FlgDPhoA-Export ins Periplasma.

Der Nachweis von FlgDPhoA im Periplasma erfolgte mittels Blau/Weiß-Selektion, Ermittlung der PhoA-Aktivität und durch Westernblotanalyse (PP = Periplasma, Z = lysierte Zellen, + = PhoA-Nachweis, ++ = PhoA-Nachweis mit starker Bande, (+) = PhoA-Nachweis mit schwacher Bande, - = kein PhoA-Nachweis, * = im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt).

<i>E. coli</i> -Stamm	Koloniefarbe bei der Blau/Weiß-Selektion	PhoA-Aktivität in % von MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	Immunologischer Nachweis beim Westernblot	
			PP	Z
MO2 pT7-5 <i>phoA</i>	weiß*	0	(+)	(+)*
MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	blau*	100	++	++*
MO2 pT7-5 9-231 <i>flgDphoA</i>	weiß*	8	++	++*
MO2 pT7-5 32-231 <i>flgDphoA</i>	weiß*	13	+	++*
MO2 pT7-5 68-231 <i>flgDphoA</i>	weiß*	2	(+)	++*
MO2 pT7-5 102-231 <i>flgDphoA</i>	weiß*	3	-	++*
MO2 pT7-5 134-231 <i>flgDphoA</i>	weiß*	0	-	++*

Im Gegensatz zu den 5'-Deletionen hatte die Entfernung von bis zu 160 AS am C-Terminus von FlgD keinen signifikanten Effekt auf den FlgDPhoA-Export ins Periplasma. Die Hybridproteine 1-100FlgDPhoA, 1-82FlgDPhoA, 1-77FlgDPhoA und 1-71FlgDPhoA zeigten PhoA-Aktivität im Enzymtest, Blaufärbung der Zellkolonien bei der Blau/Weiß-Selektion und wurden mittels Immunoblot in der periplasmatischen Fraktion nachgewiesen. Bei den FlgD-Verkürzungen 1-65, 1-32 und 1-15 waren die Zellkolonien hellblau oder weiß, die *pNPP*-Hydrolyse kaum zu messen und die Banden beim Immunoblot der periplasmatischen Fraktion sehr schwach oder nicht vorhanden. In ganzen Zellen wurden alle Hybridproteine bzw. deren Abbauprodukte detektiert. Tabelle 3.4 fasst die Ergebnisse zu den Exportuntersuchungen von 3'-deletiertem *flgD* zusammen.

Die Untersuchungen zu den FlgD-Verkürzungen zeigen insgesamt, dass die N-terminalen 71 AS bei der Aminosäuresequenz oder 71 Codons am 5'-Ende im Falle der Nukleotidsequenz als Exportsignal essentiell und damit für den PhoA-Export mittels fTTSS nötig sind.

TABELLE 3.4:**Auswirkungen von C-terminalen *flgD*-Verkürzungen auf den FlgDPhoA-Export ins Periplasma.**

Der Nachweis von FlgDPhoA im Periplasma erfolgte mittels Blau/Weiß-Selektion, Ermittlung der PhoA-Aktivität und durch Westernblotanalyse (PP = Periplasma, Z = lysierte Zellen, + = PhoA-Nachweis, ++ = PhoA-Nachweis mit starker Bande, (+) = PhoA-Nachweis mit schwacher Bande, - = kein PhoA-Nachweis, * = im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt).

<i>E. coli</i> -Stamm	Koloniefarbe bei der Blau/Weiß-Selektion	PhoA-Aktivität in % von MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	Immunologischer Nachweis beim Westernblot	
			PP	Z
MO2 pT7-5 <i>phoA</i>	weiß*	0	-	-
MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	blau*	100	+	++
MO2 pT7-5 1-100 <i>flgDphoA</i>	blau*	92	+	+*
MO2 pT7-5 1-82 <i>flgDphoA</i>	blau*	79	+	+
MO2 pT7-5 1-77 <i>flgDphoA</i>	blau*	81	++	+
MO2 pT7-5 1-71 <i>flgDphoA</i>	blau*	79	++	+
MO2 pT7-5 1-65 <i>flgDphoA</i>	hellblau*	3	(+)	+
MO2 pT7-5 1-32 <i>flgDphoA</i>	weiß*	2	-	+
MO2 pT7-5 1-15 <i>flgDphoA</i>	weiß*	6	(+)	+

3.6.3 EINFLUSS VON VERÄNDERUNGEN DER NUKLEOTID- UND AMINOSÄURESEQUENZ VON FLGD AUF DEN FLGDPhoA-EXPORT

Nachdem die Lage des Exportsignals auf die N-terminalen 71 AS bzw. Codons am 5'-Ende eingeschränkt werden konnte, sollte des Weiteren die Beschaffenheit des Signals untersucht werden. Da bei anderen TTSS die Sequenz der Codons 1 bis 15 von besonderer Bedeutung ist (Lloyd *et al.*, 2001a), sollte auch von FlgD dieser Bereich etwas erweitert und genauer untersucht werden. Eine maximale Veränderung dieser N-terminalen Aminosäuresequenz mit einer fast unveränderten Nukleotidsequenz wurde mit Rasterschubmutationen von Codon 2 bis 8, 2 bis 10 oder 2 bis 20 erreicht. Was den FlgDPhoA-Export betrifft, wurde dieser dabei stark eingeschränkt. Die PhoA-Aktivität von RF2-8FlgDPhoA betrug nur noch ca. 25 % der Aktivität von 1-231FlgDPhoA. Bei RF2-10FlgDPhoA und RF2-20FlgDPhoA war die Exportaktivität sogar auf 10 bzw. nahezu 0 % reduziert. Diese Angaben stimmen auch mit den Westernblotanalysen des Periplasmas überein. In einem weiteren Ansatz, WO2-10FlgD PhoA, wurden in die Codons 2 bis 10 stille Mutationen eingeführt, so dass hier die Nukleotidsequenz stark verändert und die Aminosäuresequenz beibehalten wurde. Im Gegensatz zu den Rasterschubmutationen war der WO2-10FlgD PhoA-Export ähnlich dem 1-231FlgDPhoA-Export (Tabelle 3.5). Diese letzten Ergebnisse

lassen vermuten, dass das Exportsignal eher Aminosäurecharakter hat, als dass eine Nukleotidsequenz auf mRNA-Ebene für den Export verantwortlich ist.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die physikochemischen Eigenschaften der N-terminalen Region von FlgD für den Export wichtig sind. Dafür wurden zunächst die Codons 2 bis 8 durch eine Nukleotidsequenz ersetzt, die alternierend für Serin und Isoleucin, also abwechselnd für eine polare bzw. unpolare AS, kodiert. Solch eine synthetische amphipathische Sequenz wurde bereits für den YopE-Export erfolgreich eingesetzt (Lloyd *et al.*, 2001b). Das Hybridprotein SI2-8FlgDPhoA wurde gemäß des Enzymtests in einem ähnlichen Ausmaß ins Periplasma exportiert wie 1-231FlgDPhoA. Auch ein weiterer Austausch von Isoleucin an Position 3 zu Leucin (SIL2-8FlgDPhoA) hatte keinen negativen Effekt auf den Export. War der Sequenzbereich 2 bis 8 jedoch deletiert (9-231FlgDPhoA) erfolgte wie bereits oben beschrieben (Kapitel 3.6.2) kein Export. Die amphipathische Sequenz fusioniert mit *phoA* allein wurde nicht transportiert. Die Ergebnisse aus Blau/Weiß-Selektion, pNPP-Hydrolyse und Immunoblot zur Beschaffenheit des FlgD-Exportsignals sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Diese Untersuchungen sind ein weiterer Hinweis darauf, dass das Exportsignal in der Aminosäuresequenz enthalten ist.

TABELLE 3.5:

Einfluss von Veränderungen der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von FlgD auf den FlgDPhoA-Export.

Der Nachweis von FlgDPhoA im Periplasma erfolgte mittels Blau/Weiß-Selektion, Ermittlung der PhoA-Aktivität und durch Westernblotanalyse (PP = Periplasma, Z = lysierte Zellen, + = PhoA-Nachweis, ++ = PhoA-Nachweis mit starker Bande, (+) = PhoA-Nachweis mit schwacher Bande, - = kein PhoA-Nachweis, * = im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt).

<i>E. coli</i> -Stamm	Koloniefarbe bei der Blau/Weiß-Selektion	PhoA-Aktivität in % von MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	Immunologischer Nachweis beim Westernblot	
			PP	Z
MO2 pT7-5 <i>phoA</i>	weiß*	0	-	(+)*
MO2 pT7-5 1-231 <i>flgDphoA</i>	blau*	100	++	+*
MO2 pT7-5 RF2-8 <i>flgDphoA</i>	blau*	25	++	+*
MO2 pT7-5 RF2-10 <i>flgDphoA</i>	blau*	10	+	+*
MO2 pT7-5 RF2-20 <i>flgDphoA</i>	weiß*	0	-	(+)*
MO2 pT7-5 WO2-10 <i>flgDphoA</i>	blau*	120	++	++*
MO2 pT7-5 SI2-8 <i>flgDphoA</i>	blau*	104	+	+*
MO2 pT7-5 SIL2-8 <i>flgDphoA</i>	blau*	75	+	+*
MO2 pT7-5 SI2-8 <i>phoA</i>	weiß*	0	-	-*

3.6.4 BEDEUTUNG DER AMINOSÄURE 52 IN FLGD FÜR DESSEN EXPORT

Da die ermittelte Signalsequenz von 71 AS im Vergleich zu anderen TTSS-Substraten um ca. 50 AS länger ist, sollte die Bedeutung des ATG-Codons für AS 52 in *flgD* als mögliches weiteres Startcodon untersucht werden. Hierzu wurde *flgD* um die ersten 51 Codons verkürzt (52-231*FlgD*PhoA). Alternativ wurde in einem weiteren Ansatz das Methionin an Position 52 in einem FlgD mit gesamter Länge gegen ein Leucin (M52L FlgDPhoA) ausgetauscht. Abbildung 3.22 zeigt das Ergebnis der Blau/Weiß-Selektion. FlgD, welches erst mit AS 52 beginnt, wurde nicht ins Periplasma transportiert und die Zellen behielten ihre natürliche weiße Farbgebung. Ein Austausch von Methionin 52 gegen Leucin im FlgD mit gesamter Proteinelänge wurde dagegen genauso transportiert wie 1-231*FlgD*PhoA mit der korrekten Aminosäuresequenz. Die Zellkolonien färbten sich blau. Der Aminosäureaustausch hatte keine negativen Auswirkungen auf die Exporteigenschaften des Substrats FlgDPhoA.

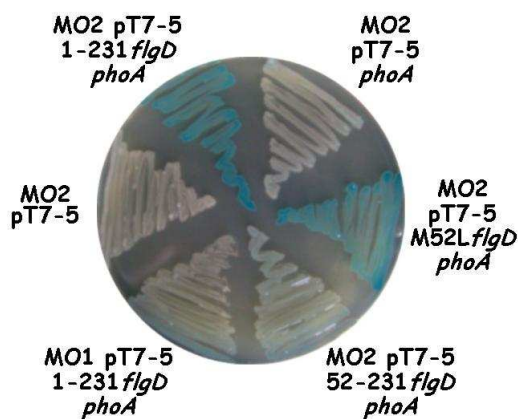


ABBILDUNG 3.22:
Blau/Weiß-Selektion zur Untersuchung der Bedeutung von Methionin 52 in FlgD.

Sowohl in MO1 pT7-5 1-231*flgD* *phoA*, MO2 pT7-5 und MO2 pT7-5 *phoA* als auch in MO2 pT7-5 52-231*flgD* *phoA* erfolgte kein Transport der Hybridproteine und die Zellkolonien blieben weiß. 1-231*FlgD*PhoA und M52L*FlgD*PhoA wurden exportiert und die Zellen färbten sich blau.

Beim Enzymtest konnten die Ergebnisse der Blau/Weiß-Selektion bestätigt werden. Bei der Positivkontrolle MO2 pT7-5 1-231*flgD* *phoA* lagen die Werte für die PhoA-Aktivität zwischen 32 und 79 U. Der Mittelwert davon wurde gleich 100 % gesetzt. Die weiteren Ansätze wurden entsprechend angepasst. Abbildung 3.23 zeigt das Diagramm der Aktivität der Alkalischen Phosphatase für die Untersuchungen der AS 52 in FlgD. MO2 pT7-5, MO2 pT7-5 *phoA* und MO2 pT7-5 52-231*flgD* *phoA* waren wie erwartet nicht aktiv und der Stamm MO1 pT7-5 1-231*flgD* *phoA* zeigte nur wenig PhoA-Aktivität. Die Hybridproteine 1-231*FlgD*PhoA und M52L*FlgD*PhoA wurden ins Periplasma transportiert und die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase lag bei 100 bzw. ca. 90 %.

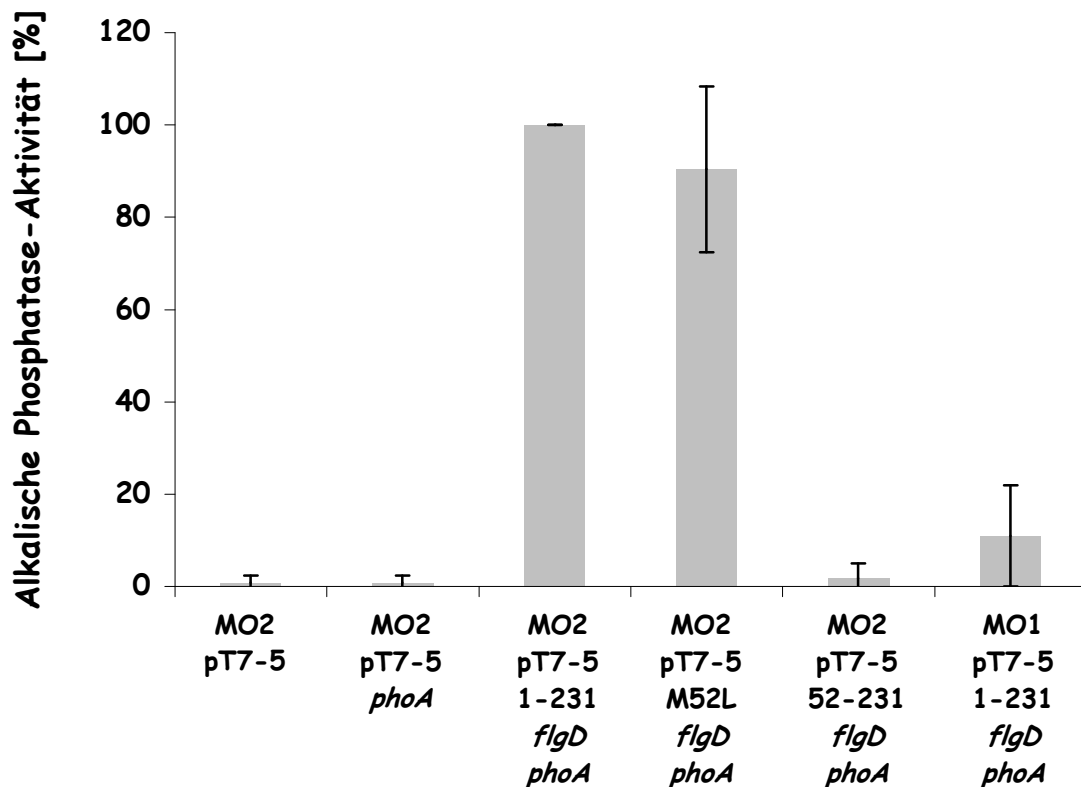


ABBILDUNG 3.23:

Aktivität der Alkalischen Phosphatase der FlgDPhoA-Hybridproteine zur Untersuchung der Bedeutung von Methionin 52 in FlgD.

Die Aktivität der Positivkontrolle 1-231FlgDPhoA ist als 100 % festgesetzt. Beim Leervektor pT7-5 und bei pT7-5*phoA* in MO2 sowie pT7-5 1-231*flgDphoA* in MO1 wurde keine oder nur sehr wenig Aktivität gemessen. Ist die AS Methionin an Position 52 in Leucin umgewandelt (M52LFlgDPhoA), hat dies kaum Einfluss auf die Aktivität im Vergleich zu 1-231FlgDPhoA. Startet das Protein FlgD erst mit dem Methionin an Position 52 (52-231FlgDPhoA), erfolgt fast kein Transport. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichung ist angegeben.

Mittels Westernblotanalyse konnte schließlich bestätigt werden, dass alle Hybridproteine in den Zellen synthetisiert worden sind, jedoch nur bestimmte FlgDPhoA-Formen ins Periplasma transportiert werden konnten. Die Abbildung 3.24 zeigt in der oberen Reihe die Detektion der Hybridproteine im Periplasma und in der unteren Reihe die gebildeten Proteine im Zellextrakt. Hier werden die beiden vorherigen Testergebnisse bestätigt und zudem gezeigt, dass eine fehlende Enzymaktivität nicht am Fehlen des Hybridproteins lag, sondern dass kein Transport ins Periplasma stattgefunden hatte.

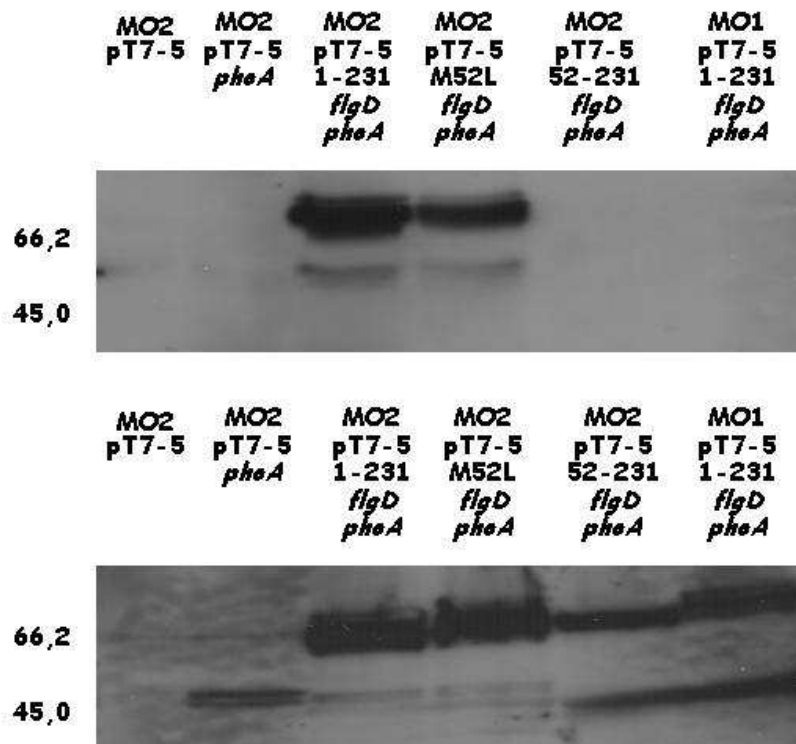


ABBILDUNG 3.24:

Westernblotanalyse der FlgDPhoA-Hybridproteine in *E. coli* MO1 und MO2 zur Untersuchung der Bedeutung von Aminosäure 52 in FlgD.

Links ist das Molekulargewicht in kDa angegeben. Der obere Teil zeigt den FlgDPhoA-Nachweis in der periplasmatischen Fraktion, der untere Bereich den im Zellextrakt. Beim Leervektor pT7-5 in MO2 (Spur 1) wurde kein Protein gebildet. PhoA allein (Spur 2) und 52-231FlgDPhoA wurden in MO2 zwar synthetisiert, aber nicht ins Periplasma der Zellen transportiert. Das komplette FlgD (Spur 3, Positivkontrolle) und FlgD mit dem Aminosäureaustausch von Methionin zu Leucin an Position 52 (Spur 4), jeweils als Hybridprotein mit PhoA, wurden in MO2 produziert und zudem ins Periplasma transportiert. In MO1 wurde das gesamte FlgD mit PhoA (Spur 6, Negativkontrolle) synthetisiert, jedoch nicht ins Periplasma transportiert.

Bei MO2 mit dem Leervektor pT7-5 (Spur 1, Abbildung 3.24) war kein Gen zur Expression vorhanden, dementsprechend konnte auch weder im Periplasma noch in ganzen Zellen Protein nachgewiesen werden. Für die Ansätze MO2 pT7-5 *phoA* (Spur 2), MO2 pT7-5 1-231 *flgDphoA* (Spur 3), MO2 pT7-5 M52L*flgDphoA* (Spur 4), MO2 pT7-5 52-231 *flgDphoA* (Spur 5) und MO1 pT7-5 1-231 *flgDphoA* (Spur 6) konnte jeweils das gebildete Hybridprotein in ganzen Zellen nachgewiesen werden, ins Periplasma wurde jedoch nur bei den Ansätzen MO2 pT7-5 1-231*flgDphoA* (Spur 3) und MO2 pT7-5 M52L*flgDphoA*

(Spur 4) Protein transportiert. Da gemäß den Untersuchungen MO2 pT7-5 M52L*flgDphoA* transportiert und MO2 pT7-5 52-231*flgDphoA* nicht transportiert wurde, hat das ATG-Codon an Aminosäureposition 52 keine Bedeutung als Startcodon für den FlgD-Export und die davorliegenden 51 Aminosäuren sind, wie bereits ermittelt (Kapitel 3.6.2), für den FlgD-Export notwendig.

Die Untersuchungen zum Exportsignal des Hakenkappenproteins FlgD ergaben insgesamt, dass das Signal auf Aminosäureebene innerhalb der N-terminalen 71 AS zu finden ist und das ATG-Codon an Position 52 keine Rolle für den Export spielt.

3.6.5 AUSWIRKUNGEN VON C-TERMINALEN FLGE-VERKÜRZUNGEN AUF DEN EXPORT VON FLGE_{PHO}A

Auch der Export des Hakenproteins FlgE sollte untersucht werden. Hierbei wurden zunächst verschieden lange Verkürzungen am C-terminalen Bereich von FlgE eingeführt. Es sollte dadurch überprüft werden, welcher Bereich des Proteins für den Transport oder die Erkennung beim Export verantwortlich ist. In den verschiedenen Ansätzen sollten dann die Hybridproteine 1-10FlgE_{PhoA}, 1-20FlgE_{PhoA}, 1-50FlgE_{PhoA}, 1-100FlgE_{PhoA}, 1-200FlgE_{PhoA}, 1-300FlgE_{PhoA} und 1-402FlgE_{PhoA} (FlgE in seiner gesamten Länge) in *E. coli* MO1 und MO2 generiert werden. Auch hier wurde vorab die Blau/Weiß-Selektion zur Überprüfung des FlgE_{PhoA}-Exports anhand der Blaufärbung der Zellkolonien durchgeführt. Gemäß Abbildung 3.25 war nur das Hybridprotein 1-402FlgE_{PhoA} im *E. coli*-Stamm MO2 aktiv. Die C-terminal verkürzten FlgE-Proteine mit den AS 1 bis 10, 1 bis 20, 1 bis 50 bzw. 1 bis 100 wurden in MO2 nicht ins Periplasma transportiert. In MO1 erfolgte wie erwartet auch kein Export der zuvor aufgelisteten Hybridproteine und damit keine Blaufärbung der Kolonien. Zusätzlich wurden die Hybridproteine 1-200FlgE_{PhoA} und 1-300FlgE_{PhoA} sowohl in MO2 als auch in MO1 getestet. Auch hier erfolgte keine Blaufärbung der Zellkolonien.

Dann folgte auch die Bestimmung der PhoA-Aktivität durch *p*NPP-Hydrolyse im Enzymtest für die einzelnen FlgE_{PhoA}-Hybridproteine. Diese lag für das Hybridprotein mit FlgE in seiner gesamten Länge zwischen 10 und 25 Miller units, also im Vergleich nur bei 30 % der Aktivität von FlgD mit seiner gesamten Länge. Die Aktivität der C-terminal verkürzten FlgE_{PhoA}-Hybridproteine fiel noch geringer aus und lag im Vergleich zwischen 10 und 30 % der Aktivität von FlgE mit seiner gesamten Länge. Auch die Aktivität der Negativkontrolle MO1 pT7-5 1-402*flgEphoA* betrug ca. 20 % im Vergleich zu MO2 pT7-5 1-402*flgEphoA*. Ein unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Hybridproteine gemäß ihrer Verkürzungen war trotz der niedrigen Messwerte nicht zu beobachten. Alle

FlgEPhoA-Hybridproteine wurden auch im Zellextrakt und in der periplasmatischen Fraktion der *E. coli* Stämme MO1 und MO2 gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach einer Westernblotanalyse unterzogen. Dabei konnten alle Fusionsproteine, einschließlich 1-402FlgEPhoA in MO2, weder in ganzen Zellen noch im Periplasma detektiert werden.

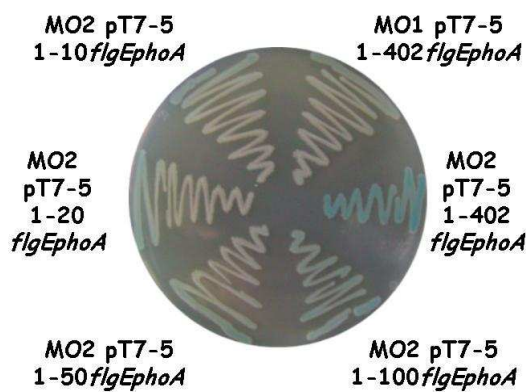


ABBILDUNG 3.25:
Blau/Weiß-Selektion zur Untersuchung von FlgEPhoA-Hybridproteinen.

Sowohl in der Negativkontrolle MO1 pT7-5 1-402*flgEphoA* als auch bei den Hybridproteinen 1-10FlgEPhoA, 1-20 FlgEPhoA, 1-50FlgEPhoA und 1-100 FlgEPhoA in MO2 erfolgte keine Blaufärbung der Zellkolonien. Nur 1-402 FlgEPhoA wurde bei MO2 ins Periplasma transportiert und die Zellen färbten sich blau.

Was das Substrat FlgE betrifft, konnte schließlich nur mit Hilfe der Blau/Weiß-Selektion und des Enzymtests und dabei nur für das Protein in seiner gesamten Länge ein Nachweis des Exports bestätigt werden.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten lösliche Komponenten des fTTSS von *E. coli* K12 und deren Funktion mit Hilfe von molekularbiologischen und biochemischen Methoden näher untersucht werden. Dabei ergaben sich zwei Schwerpunkte. Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit möglichen Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten des cytoplasmatischen Teils des flagellären Exportapparates, FliH, FliI und FliJ. Im zweiten Abschnitt sollte die Lage und Beschaffenheit einer Exportsignalsequenz der durch das fTTSS zu transportierenden Substrate zunächst am Beispiel von FlgD und später auch an FlgE näher untersucht werden.

4.1 KOMPLEMENTATION VON DELETIONSMUTANTEN DURCH REKOMBINANTE PROTEINE

Damit die einzelnen Komponenten des cytoplasmatischen Teils des flagellären Exportapparates FliH, FliI und FliJ individuell näher untersucht werden konnten, sollten diese in *E. coli* synthetisiert und dann mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Da diese rekombinanten Proteine „tags“ für die Reinigung besaßen, wurde zunächst ihre Aktivität in entsprechenden *fliH*-, *fliI*- und *fliJ*-Deletionsmutanten von *E. coli* CC181 überprüft.

Zur Herstellung dieser Deletionsmutanten wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Bei der Methode nach Datsenko und Wanner (2000) wurde das Gen für die Chloramphenicolresistenz in Form von linearer DNA in die Zellen transformiert und gegen das zu deletierende Gen ausgetauscht. Die lineare DNA wurde mittels PCR generiert. Dabei wurden die homologen genomischen Sequenzbereiche für die Rekombination mit Hilfe der Primer angefügt. Die Länge der homologen Sequenzbereiche betrug deshalb nur ca. 50 bp. Mit diesen relativ kurzen homologen Sequenzbereichen waren Rekombinationsereignisse selten. Da zudem lineare DNA im Vergleich zu zirkulärer DNA schlechter von den Zellen aufgenommen werden konnte und in den Zellen nicht so stabil war, war die Ausbeute an Klonen sehr gering. Zur Erhöhung der Ausbeute an Klonen wurde die Transformation mittels Elektroporation durchgeführt und sowohl Zellen als auch DNA in hohen Konzentrationen und möglichst geringen Volumina eingesetzt.

Die Methode nach Herring et al. (2003) war dagegen vor der Transformation mit mehr Aufwand verbunden, da das Ersatzgen, in diesem Fall das Gen für die Kanamycinresistenz, und die homologen genomischen Sequenzbereiche für die Rekombination nacheinander in einen Vektor kloniert werden mussten. Damit war aber die Möglichkeit

gegeben, die homologen Sequenzbereiche mit ca. 500 bp länger als bei der Methode nach Datsenko und Wanner (2000) zu wählen. Durch Verwendung von zirkulärer DNA und längeren homologen Sequenzbereichen war im Vergleich der beiden Methoden die Rekombination effizienter und die Ausbeute an Klonen höher.

Die hergestellten Deletionsmutanten wurden dann in einem plasmidabhängigen System mit den rekombinanten Proteinen komplementiert. Als Plasmide wurden die pASK-IBA-Vektoren gewählt, und die rekombinanten Proteine waren mit einem Strep-tag II und/oder einem 6 x His-tag versehen. Eine erfolgreiche Komplementation bedeutete, dass das synthetisierte Protein trotz der vorhandenen „tags“ aktiv und nicht in seiner Funktion gestört war. Bei FliJ hatten die „tags“ keinen Einfluss auf die Proteinfunktion. FliH und FliI waren dagegen mit „tags“ an beiden Termini nicht funktionell und konnten die Deletion im entsprechenden Stamm nicht komplementieren. Die Untersuchungen mit Hilfe des plasmidabhängigen Komplementationssystems ergaben jedoch, dass FliH einen 6 x His-tag am C-Terminus und einen Strep-tag II am N-Terminus toleriert. FliI war dagegen mit C-terminalen „tags“ aktiv, ein N-terminaler Strep-tag II sorgte jedoch für eine leichte Einschränkung (Abbildung 3.9). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Lage der „tags“ Einfluss auf die jeweilige Proteinfunktion hatte. Entsprechend konnten für die weiteren Untersuchungen die aktiven rekombinanten Proteine gewählt werden.

4.2 FLIH, FLII UND FLIJ BILDEN EINEN HETEROOLIGOMEREN KOMPLEX

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Co-Reinigung die postulierte Komplexbildung von FliH, FliI und FliJ bestätigt werden (Abbildung 3.10). Dafür wurden die Komponenten FliH und FliJ durch Westernblotanalysen nachgewiesen und die Komponenten FliH und FliI durch MALDI-TOF-Analysen bestätigt.

Für die Ermittlung der Stöchiometrie der einzelnen Komponenten des heterooligomeren Komplexes zueinander wurde mit Hilfe von ImageQuant 5.0 das Coomassie-Gel des gelelektrophoretisch aufgetrennten, zehnfach konzentrierten Eluats ausgewertet. Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte der einzelnen Komponenten konnte eine Stöchiometrie von 30:1:10 für FliH zu FliI zu FliJ bestimmt werden. Dabei wurden auch die Abbauprodukte von FliH einbezogen. Das damit für FliH zu FliJ ermittelte molare Verhältnis von 3:1 zeigt zwar Übereinstimmung mit dem Ergebnis der ITC (Kapitel 4.6). Da die FliH-Abbauprodukte gemäß Westernblot jedoch noch den Strep-tag II besaßen, könnten diese auch an das Strep-Tactin gebunden haben, ohne Interaktionen mit dem Komplex einzugehen. Das molare FliH-FliI-FliJ-Verhältnis betrug ohne die Abbau-

produkte von FliH 20:1:10 und die Stöchiometrie von FliH zu FliJ damit 2:1. Der Anteil von FliI im FliHIJ-Komplex war sehr gering. Es war jedoch bei der gewählten Methode naheliegend, dass während der Affinitätschromatographie beim Waschen dem Komplex zugehörige Komponenten abgespült worden sind. Das konnte neben FliI in geringerem Ausmaß auch FliJ gewesen sein, da FliH beim letzten Reinigungsschritt die Bindung zur Säule einging.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik der Stöchiometriebestimmung durch die Co-Reinigung liegen dem in Abbildung 4.1 dargestellten möglichen Modell der Bildung des FliHIJ-Komplexes bereits bekannte Daten aus Abbildung 1.4 und die FliI-FliJ-Interaktion als Ergebnis aus der SPR (Kapitel 4.6) zugrunde. Die Bildung eines heterotrimeren FliH₂FliI-Komplexes konnte dabei bereits von Minamino und Macnab (2000c) gezeigt werden. Fraser *et al.* (2003) stellten die FliJ-FliH-Interaktion und eine Oligomerisierung von FliJ mindestens zum Dimer fest.

Neben der Komplexbildung von FliH, FliI und FliJ war die Bindung aller oder einzelner dieser Komponenten mit einem fTTSS-Substrat von Interesse. Insbesondere sollte überprüft werden, ob FliJ, das als allgemeines Chaperon für die Substrate des Stab- und Hakentyps und auch des Filamenttyps vermutet wurde (Bennett und Hughes, 2000; Minamino *et al.*, 2000a), tatsächlich eine Bindung zu FlgD oder FlgE eingeht. Denn von allen bisher bekannten Komponenten des gesamten flagellären Exportapparates wurden vier aufgrund ihres geringen Molekulargewichts und ihres niedrigen isoelektrischen Punktes (pI) als Chaperone eingeschätzt. Dabei handelte es sich um FlgN, FliJ, FliS und FliT (Bennett und Hughes, 2000), wobei der pI-Wert von FliJ mit 7,85 (Tabelle 7.1.2 im Anhang) höher liegt und damit aus der Reihe fällt. Für die Chaperone FlgN, FliS und FliT konnten auch schon die Substrate ermittelt werden. FlgN ist das Chaperon für die Haken-Filamentverbindungen FlgK und FlgL, FliS für das Filamentprotein FliC und FliT für das Filamentkappenprotein FliD (Bennett und Hughes, 2000).

Mit Hilfe der Co-Expression der Gene *fliH*, *fliI* und *fliJ*, einzeln oder in Kombinationen, zusammen mit dem Gen eines der Substrate, *flgD* oder *flgE*, sollten im Rahmen dieser Arbeit durch nachfolgende Co-Reinigung oder native Gelelektrophorese Bindungen zwischen den Proteinen überprüft werden. Interaktionen zwischen dem nachgewiesenen FliHIJ-Komplex mit einem der Substrate FlgD oder FlgE entsprechend der Komplexbildung von FliH, FliI, Substrat FlgK und Chaperon FlgN (Thomas *et al.*, 2004) konnten dabei nicht gezeigt werden.

Aber auch Bindungen der einzelnen Komponenten FliH, FliI oder FliJ zu einem der beiden Substrate konnten bei den eigenen Untersuchungen weder durch Co-Reinigung noch durch native Gelelektrophorese festgestellt werden. Frühere Veröffentlichungen zeigten dagegen Bindungen von FlgE, FlgD, FlgK, FlgL und FliC jeweils an FliH, FliI oder FliJ in Affinitätsblots (Minamino und Macnab, 2000a; Silva-Herzog und Dreyfus, 1999). Ob insbesondere FliJ tatsächlich mit den Substraten interagiert, obwohl es Bindestellen für die Chaperone FlgN und FliT besitzt (Evans *et al.*, 2006), ist fraglich. Die eigenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass keine Bindung zwischen FliJ und einem der Substrate FlgD oder FlgE stattfindet.

Die sich hier widersprechenden Daten weisen auf die Problematik der *in vitro*-Versuche hin. Nach der Präparation der Proteine aus den Zellen liegen artifizielle Bedingungen vor, bei denen Proteine auch durch Aggregation komplexieren können. Eine im Versuch nachgewiesene Komplexbildung muss *in vivo* in der Zelle unter physiologischen Bedingungen nicht unbedingt erfolgen.

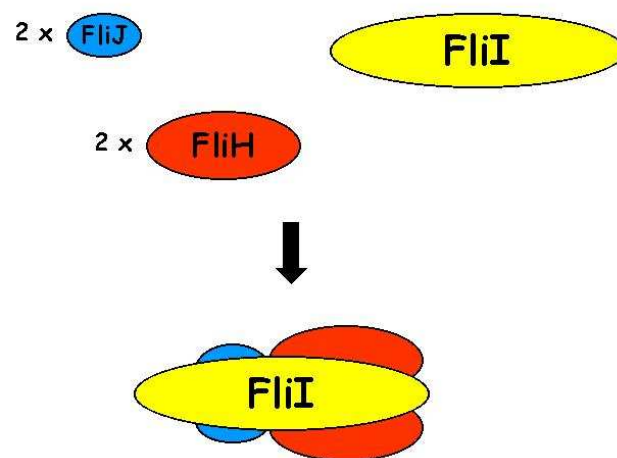


ABBILDUNG 4.1:

Bildung des FliHIJ-Komplexes aus den einzelnen Komponenten.

Modell der Bildung des FliHIJ-Komplexes nach Co-Expression und Co-Reinigung der einzelnen Komponenten unter Berücksichtigung bereits bekannter Daten und der Ergebnisse aus der SPR. Nach Fraser *et al.* (2003a) interagieren jeweils zwei FliH- und FliJ-Moleküle mit einem FliI-Molekül. Dabei interagieren der C-terminale Bereich von FliJ mit dem N-terminalen Bereich von FliH und die C-terminale Region von FliH mit der N-terminalen Region von FliI. Gemäß den Untersuchungen mittels SPR interagieren auch FliI und FliJ miteinander. FliI ist entsprechend entgegen der Konvention vom C-Terminus zum N-Terminus dargestellt.

4.3 INDIVIDUELLE REINIGUNG VON FLIH, FLII UND FLIJ

Für die Interaktionsversuche mit den Proteinen des cytoplasmatischen Teils des flagellären Exportapparates wurden FliH, FliI und FliJ individuell gereinigt, nachdem deren Gene zuvor mit Hilfe der pASK-IBA-Vektoren in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert worden sind. Je nach Wahl des pASK-IBA-Vektors waren die Proteine dann mit einem terminalen Strep-tag II bzw. 6 x His-tag oder mit beiden „tags“ an jeweils einem Terminus versehen.

Bei den beiden Proteinen FliH und FliJ war es möglich, diese mit Strep-tag II und 6 x His-tag mittels Affinitätschromatographie über zwei verschiedene Säulen zu reinigen (Abbildung 3.11). Dabei konnten FliH und FliJ mit einer Reinheit von ca. 90 % und bei Einsatz eines geringen Elutionsvolumens auch relativ konzentriert mit ca. 1 mg/ml erhalten werden. Bei der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie über nur eine Säule und nachfolgender Gelfiltration oder Anionenaustauschchromatographie war eine entsprechende Reinheit und Konzentration an Protein nicht zu erreichen.

Nachteil der Methode, Proteinen Strep-tag II und 6 x His-tag jeweils an einen Terminus zu fügen, war die mögliche Einschränkung der Funktion und/oder Bindemöglichkeit der Proteine durch die beiden „tags“. Da die Proteine FliH, FliI und FliJ hauptsächlich über ihre Termini miteinander interagieren (Fraser *et al.*, 2003a), war die Gefahr solch einer Einschränkung bei zwei „tags“ noch größer als bei einem. Diese Funktionseinschränkungen konnten bei den Komplementationsstudien für FliH und FliJ bestätigt werden (Kapitel 4.1). Entsprechend wurden für die Interaktionsstudien bei der SPR (Kapitel 4.6) die Proteine FliI, FliH und FliJ mit nur einem „tag“ verwendet, wobei auf einen höheren Reinheitsgrad verzichtet werden musste. Ein weiterer Nachteil der Proteinreinigung mit „tags“ ist deren mögliche Unzugänglichkeit. Die Affinität zwischen rekombinantem Protein und Säule ist dann aufgehoben. Für FliI mit einem C-terminalen 6 x oder 12 x His-tag konnte trotz Synthese des Proteins und möglichem immunologischen Nachweis der His-tags vermutlich aus Gründen einer Unzugänglichkeit keine effiziente Reinigung erfolgen. Damit konnte FliI nur mit Hilfe des Strep-tag II angereichert und dann weiter durch Gelfiltration oder Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden.

4.4 OLIGOMERISIERUNG VON FLIH BZW. FLII *IN VITRO*

Während durch die Gelfiltration die Reinheit der FliH- und FliI-Präparationen nicht signifikant verbessert werden konnte, wurde jedoch anhand der Elutionsprofile für jedes einzelne der beiden Proteine ein Oligomerisierungsverhalten beobachtet. Dabei wurden die beiden Proteine hauptsächlich bei einem Molekulargewicht von ca. 600 kDa eluiert (Abbildung 3.12). Das würde einem Homododecamer bei FliI (49 316 Da) und bei FliH (25 050 Da) einem Oligomer aus 24 FliH-Monomeren entsprechen.

Für FliI konnte zuvor nur eine Oligomerisierung in Form einer hexameren Ringstruktur in Lösung durch Elektronenmikroskopie gezeigt werden (Claret *et al.*, 2003; Minamino *et al.*, 2006b). Im Gegensatz dazu wurde für die ATPase HrcN des TTSS aus *P. syringae* bei der Affinitätschromatographie auch ein Oligomerisierungsverhalten mit bis zu 12 HrcN-Monomeren festgestellt und mit Hilfe verschiedener Techniken der Elektronenmikroskopie ein Dodecamer in Form von zwei übereinander liegenden hexameren Ringen bestätigt (Müller *et al.*, 2006, Pozidis *et al.*, 2003). Dies unterstützt die Ergebnisse der eignen Untersuchungen zur fTTSS-ATPase FliI. Da von einem molekularen 1:2-Verhältnis von FliI zu FliH *in vivo* ausgegangen wird (González-Pedrajo *et al.*, 2002), müsste für ein FliI-Dodecamer auch das ermittelte FliH-Oligomer aus 24 Monomeren zur Verfügung stehen. Andererseits konnten Yonekura *et al.* (2000) für das Filamentkappenprotein FliD die Bildung eines Decamers, bestehend aus zwei pentameren Ringen, nur in Lösung mittels Elektronenmikroskopie feststellen. FliD in seiner Funktion als Filamentkappe in der wachsenden Struktur des Filaments wurde dagegen eindeutig als einfacher Pentamer-Ring bestimmt. Es stellt sich daher die Frage, ob der festgestellte hohe Oligomerisierungsgrad von FliI und FliH nur *in vitro* besteht. Zumindest für die fTTSS-ATPase FliI kann die Oligomerisierung zum Dodecamer auch *in vivo* realistisch sein, da dadurch deren eigene ATPase-Aktivität stimuliert wird (Kapitel 4.5 und Abbildung 4.2).

Ob die hier festgestellten Oligomerisierungen von FliH und FliI auch zu einem Vielfachen des in Abbildung 4.1 dargestellten FliHIJ-Komplexes führen, ist eher unwahrscheinlich. Da die N-terminalen Regionen von FliI sowohl mit FliH interagieren (Fraser *et al.*, 2003a) als auch für die Bildung eines FliI-Sechseringes verantwortlich sind (Minamino *et al.*, 2006b), besteht der FliHIJ-Komplex vermutlich nur vor der Bildung des FliI-Dodecamers.

4.5 STIMULATION DER ATPASE-AKTIVITÄT VON FLII DURCH OLIGOMERISIERUNG

Nach der Reinigung von FliI mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration wurden von den erhaltenen Eluatfraktionen des FliI-Monomers und -Dodecamers die ATPase-Aktivitäten bestimmt. Dabei zeigte das FliI-Monomer keine ATPase-Aktivität, das FliI-Dodecamer dagegen eine Zunahme der ATPase-Aktivität mit zunehmender FliI-Konzentration (Abbildung 3.13). Die ATPase-Aktivität für das FliI-Dodecamer betrug bei eingesetzten 3 µg/ml FliI-Protein 36 nmol $P_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und konnte bei Verwendung der ca. 10-fachen Konzentration an FliI-Protein auf das ca. 100-fache gesteigert werden.

Für die TTSS-ATPase HrcN aus *P. syringae* ist bereits bekannt, dass das HrcN-Dodecamer im Vergleich zum -Monomer die ATPase-Aktivität stimuliert und dabei sogar auf das ca. 700-fache erhöht (Pozidis *et al.*, 2003). Demnach scheint bei den eigenen Untersuchungen die Oligomerisierung von FliI zu einem Dodecamer zu Beginn der Messreihe aufgrund der Verdünnung und/oder der Gegenwart von N-Dodecylmaltosid im Versuchsansatz aufgehoben zu sein. Für FliI selbst wurde in früheren Publikationen eine Oligomerisierung zum Hexamer in Form eines Sechserings mit einer Stimulation der ATPase-Aktivität auf 1290 bzw. 2200 nmol $P_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Auvray *et al.*, 2002; Minamino *et al.*, 2006b) gezeigt. Ein vergleichbarer Wert konnte bei den eigenen Messungen bei einer Konzentration von 24 µg/ml FliI-Protein erreicht werden. Dieser Zwischenwert lässt vermuten, dass die Oligomerisierung von FliI zum Dodecamer über die Stufe des Hexamers erfolgt. Abbildung 4.2 zeigt in einem Modell die Oligomerisierung vom FliI-Monomer zum FliI-Dodecamer, einhergehend mit der Stimulation der ATPase-Aktivität. Das FliI-Dodecamer ist in Form von zwei Sechseringen in Anlehnung an die Publikation für die TTSS-ATPase HrcN aus *P. syringae* dargestellt (Müller *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wurde bei Claret *et al.* (2003) und Minamino *et al.* (2006b) auch für ein FliI-Monomer ATPase-Aktivität mit Werten zwischen 250 und 280 nmol $P_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ festgestellt. Aufgrund der Schwierigkeiten bei den eigenen Arbeiten, FliI über „tags“ zu reinigen, war die FliI-Präparation noch mit weiteren Proteinen kontaminiert (Abbildung 3.11). Eines der Proteine könnte aufgrund der nachgewiesenen Bindung an FliI (Kapitel 4.2 und 4.6) endogenes FliH gewesen sein. Von FliH ist bekannt, dass es die ATPase FliI hemmt (Auvray *et al.*, 2002; Minamino und Macnab, 2000a). Verunreinigungen von FliH in der FliI-Präparation könnten damit der Grund für die nicht messbare ATPase-Aktivität gewesen sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von FliH auf das FliI-Dodecamer überprüft. Es zeigte sich jedoch weder eine Hemmung noch eine Stimulation der ATPase-Aktivität von FliI durch FliH im

ATPase-Test. Vermutlich erfolgt die Hemmung der ATPase-Aktivität von FliI durch FliH nur beim monomeren Zustand von FliI. Nach der Bildung des FliI-Dodecamers ist dann eine Hemmung durch FliH nicht mehr möglich.

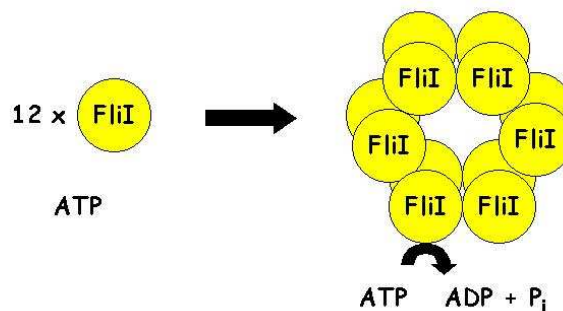


ABBILDUNG 4.2:

Oligomerisierung von FliI zum Dodecamer und Stimulation der ATPase-Aktivität.

In diesem Modell zeigen die FliI-Monomere keine Hydrolyse von ATP und damit keine ATPase-Aktivität. Durch Oligomerisierung von FliI zum Dodecamer wird die ATPase-Aktivität stimuliert. Das FliI-Dodecamer ist in Anlehnung an HrcN aus *P. syringae* in Form von zwei hexameren Ringen dargestellt (Müller *et al.*, 2006).

4.6 AFFINITÄTEN ZWISCHEN FliH, FliI UND FliJ

Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten des cytoplasmatischen Teils des flagellären Exportapparates, FliH, FliI und FliJ, wurden bisher weder hinsichtlich der thermodynamischen noch der kinetischen Parameter genauer untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nun mit Hilfe der SPR und der ITC Bindungen zwischen diesen Komponenten festgestellt und Affinitäten bestimmt werden. FliH, FliI und FliJ interagieren jeweils miteinander. Die Affinitätskonstante für die Bindung von FliH an FliI beträgt 1,52 μM , die von FliJ an FliI 3,63 μM und die von FliH an FliJ 0,76 μM . Damit hat FliH eine höhere Affinität zu FliJ als zu FliI. Zudem ist die Affinität von FliH zu FliI höher als die von FliJ zu FliI. Im Vergleich zu Antigen-Antikörper-Bindungen, deren Affinitätskonstanten im nM-Bereich liegen (Papalia *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2006), sind die hier ermittelten Affinitäten jedoch um den Faktor 1000 geringer. Die

Affinität zwischen der Sensorkinase CheA und dem Antwortregulator CheY, beides Komponenten des Signaltransduktionskomplexes, ist mit einer Konstante von 30 nM auch noch vergleichsweise höher (Schuster *et al.*, 1993). Die hier ermittelten moderaten Affinitäten zwischen FliH, FliI und FliJ stehen jedoch im Einklang mit einer für den Proteinexport notwendigen Dynamik der Bildung und Dissoziation von Proteinkomplexen. Die Affinitätskonstante für die Bindung des Filamentproteins FliC an sein Chaperon FliS liegt mit 0,53 μ M (Muskotál *et al.*, 2006) entsprechend in einer ähnlichen Größenordnung.

Neben den Affinitäten konnten mit Hilfe der SPR für die FliI-FliH- und die FliI-FliJ-Interaktion auch die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und die Dissoziation ermittelt werden. Diese liegen für beide Interaktionen in derselben Größenordnung. Die beiden Geschwindigkeitsassoziationskonstanten für die Bindung von FliH an FliI hatten Werte von $1,03 \cdot 10^4$ und $2,89 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, die beiden Geschwindigkeitsdissoziationskonstanten Werte von $1,87 \cdot 10^{-2}$ und $7,06 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation von FliJ und FliI betrug $3,68 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation $1,12 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Bindung von CheA an CheY hat dagegen eine vergleichsweise niedrige Assoziationsrate mit einer Konstanten von $3,68 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und eine im Vergleich niedrige Dissoziationsrate mit einer Konstanten von $1,14 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Schuster *et al.*, 1993). Die höheren Raten für Bildung und Dissoziation sowohl zwischen FliH und FliI als auch zwischen FliJ und FliI sind ein weiterer Hinweis für die Dynamik der jeweiligen Interaktionen.

Die jeweils hohen Standardabweichungen der ermittelten Werte bei der SPR (Tabelle 3.1) sind durch verschiedene Probleme zu erklären. Nach den jeweiligen Messungen musste restliches, nicht dissoziiertes FliH oder FliJ von FliI auf dem CM5-Sensorchip bei der sogenannten Regeneration mit Hilfe von hochmolaren Salzlösungen wie 4 M MgCl_2 und 5 M NaCl oder sogar verdünnte NaOH (1 bis 20 mM) gelöst werden. Unter diesen nicht physiologischen Bedingungen könnte ein Teil der FliI-Proteine geschädigt worden sein. Da die Regeneration nach jeder Interaktionsmessung durchgeführt wurde, waren bei den verschiedenen Messungen vermutlich die Ausgangsvoraussetzungen für FliI unterschiedlich. Zur Umgehung dieser Problematik wurden bereits Protokolle für die Messung von Kinetiken und Formeln zur Berechnung der kinetischen Daten entwickelt, bei denen der Ligand zwischen den Messungen nicht mehr regeneriert werden muss. Dadurch wurde der Ligand geschont und zudem der zeitliche Aufwand für die Versuche durch das Fehlen der Regenerationsphasen erheblich verkürzt (Karlsson *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Trutnau, 2006).

Eine weitere Möglichkeit für die hohen Standardabweichungen kann der Reinheitsgrad von FliI gewesen sein. FliI konnte mit Hilfe der Affinitätschromatographie nur zu 50 % angereichert werden. Zwar wurde durch die Bindung von FliI über den Strep-tag II an Strep-Tactin auf dem CM5-Sensorchip nochmals selektiert, trotzdem wurden vermutlich auch Fremdproteine mit einer Affinität zu Strep-Tactin an der Chipoberfläche gebunden. Solche Fremdproteine könnten die Messungen beeinflusst haben. Auch die Messung der Bindung der kleineren Proteine FliH und FliJ im Gegensatz zum größeren Protein FliI kann zu Messungenauigkeiten geführt haben. Wenn es die Experimente zulassen, wählt man das größere Protein als Analyt damit man ein stärkeres und damit eindeutigeres Antwortsignal erhält.

Mit Hilfe der ITC konnten thermodynamische Parameter der FliH-FliJ-Interaktion ermittelt werden. Dabei wurde bei der Bindung von FliH und FliJ Energie freigesetzt. Die freie Bindungsenergie betrug $-36,33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei 37°C und pH 8,0. Auch das molare Verhältnis von FliJ zu FliH konnte auf 1:3 bestimmt werden. Diese Verhältnisangabe stimmt zwar mit dem Ergebnis aus der Co-Reinigung (Kapitel 4.2) überein, steht jedoch im Gegensatz zu den Literaturangaben. Bei Fraser *et al.* (2003a) wird von einer Dimerisierung sowohl von FliH als auch von FliJ ausgegangen. Die Dimere interagieren dann im Verhältnis von 1:1 miteinander. Die Methode der ITC bei den eigenen Untersuchungen erforderte hohe, unphysiologische Konzentrationen von den Proteinen FliH und FliJ. Da FliH und FliJ auch bei der Dialyse leicht aggregierten, könnten hohe Proteinkonzentrationen Einfluss auf die Komplexbildung genommen haben. Unter den artifiziellen Bedingungen könnte sich ein Komplex aus einem FliJ- und drei FliH-Molekülen gebildet haben, der *in vivo* jedoch nicht bestehen würde.

4.7 DIE N-TERMINALEN 71 AMINOSÄUREN SIND FÜR DEN EXPORT DES SUBSTRATS FLGD ESSENTIELL

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen über die Lage und Beschaffenheit eines Exportsignals bei Substraten des fTTSS. Dabei wurde zunächst das Hakenkappenprotein FlgD gewählt. FlgD ist als Kappe für die Hakensynthese aus FlgE essentiell und wird zu den Substraten des Stab- und Hakentyps gezählt. Nach der Hakensynthese wird FlgD aus der Struktur des wachsenden Flagellums in die Umgebung der Bakterienzelle entlassen (Kutsukake und Doi, 1994; Ohnishi *et al.*, 1994).

Für die Untersuchungen des Exportsignals von FlgD war bereits ein Testsystem vorhanden. Innerhalb dieses Testsystems wurden mit Hilfe des fTTSS FlgDPhoA-Hybridproteine ins Periplasma des *E. coli*-Stamms MO2 transportiert. Im Periplasma war PhoA aktiv und konnte mittels Westernblot und durch Enzymtests nachgewiesen werden (Weber-Sparenberg *et al.*, 2006).

Damit die Lage des Exportsignals von FlgD bestimmt werden konnte, wurde das Protein zunächst in C- und N-terminal verkürzten Formen im Testsystem eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass bereits N-terminale Verkürzungen von 8 bis 134 AS den Export von FlgDPhoA drastisch oder total reduzierten, d. h. ein Export von FlgD ohne den N-terminalen Bereich nicht möglich war. Diese N-terminale Lage des Exportsignals stimmt auch mit anderen TTSS- bzw. fTTSS-Substraten überein. Die Exportsignale des Effektorproteins YopE aus *Y. enterocolitica* (Lloyd *et al.*, 2001a) und des Filamentproteins FliC aus *S. typhimurium* (Kuwajima *et al.*, 1989) sind auch N-terminal lokalisiert. Mit Hilfe der C-terminal verkürzten Formen von FlgD konnte dann die N-terminale Lage des Exportsignals auf 71 AS eingegrenzt werden. Der Enzymtest und die Westernblotanalysen ergaben, dass das Hybridprotein 1-71FlgDPhoA noch exportiert wurde, das Hybridprotein 1-65FlgDPhoA dagegen nicht mehr. Diese Ergebnisse wurden unter Weber-Sparenberg *et al.* (2006) bereits veröffentlicht. Im Vergleich zu den Exportsignalen von YopE und YplA aus *Y. enterocolitica* sowie SopE aus *S. typhimurium* mit N-terminalen 15 bzw. im Falle von YplA 20 AS (Boyd *et al.*, 2000; Karavolos *et al.*, 2005; Warren und Young, 2005), ist das Signal von FlgD mit 71 AS sehr lang. Da die Überlänge etwa 50 AS betrifft, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Rolle eines möglichen zweiten Startcodons in FlgD an Codonposition 52 für den Export untersucht. Ein Austausch der Aminosäure Methionin 52 gegen ein Leucin in FlgD veränderte das Exportverhalten von FlgDPhoA nicht gegenüber einem FlgD mit korrekter Aminosäureabfolge. Die verkürzte Form von FlgD in 52-231 FlgDPhoA wurde dagegen nicht transportiert. Damit wurde die Länge des N-terminalen Exportsignals bei FlgD von 71 AS und die Bedeutungslosigkeit von ATG an Codonposition 52 zumindest für den FlgD-Transport bestätigt (Abbildungen 4.3 und 4.4).

Als weiteres Substrat des fTTSS sollte in dieser Arbeit das Hakenprotein FlgE auf sein Exportsignal hin untersucht werden. FlgE gehört auch wie FlgD zu den Substraten des Stab- und Hakentyps. Durch C-terminale Verkürzungen wurden hier zunächst verschiedene Längen des Proteins hergestellt. Damit sollte überprüft werden, welcher Teil von FlgE für den Export verantwortlich ist. Es konnte sowohl beim Plattentest über die Blau/Weiß-Selektion als auch über den Enzymtest festgestellt werden, dass allein FlgEPhoA mit

einem FlgE von gesamter Länge transportiert wurde. Beim Plattentest färbten sich nur die Zellkolonien mit dem Hybridprotein 1-402FlgEPhoA blau (Abbildung 3.25) und beim Enzymtest konnte auch nur bei FlgE mit gesamter Länge eine erhöhte PhoA-Aktivität bei einem gegenüber den FlgDPhoA-Untersuchungen sehr niedrigem Aktivitätsniveau ermittelt werden. Bei den Westernblotanalysen konnten dann die verschiedenen FlgEPhoA-Hybridproteine weder in der periplasmatischen Fraktion noch in ganzen Zellen nachgewiesen werden. Dass gerade der Export von FlgE in seiner gesamten Länge bei Versuchen, die direkt in den Zellen auf der Platte oder unverzüglich nach Präparation der periplasmatischen Fraktion durchgeführt wurden, bestätigt werden konnte, lässt instabile FlgE-PhoA-Hybridproteine zumindest bei den verkürzten FlgE-Formen vermuten. Ein im Periplasma möglicher proteolytischer Abbau von FlgE wird auch bei Bonifield *et al.* (2000) diskutiert. Mit Hilfe des für die FlgDPhoA-Hybridproteine etablierten Testsystems war letztlich keine detaillierte Untersuchung des Exportsignals von FlgE möglich. Dieses unterschiedliche Verhalten von FlgD und FlgE im Exporttestsystem kann auch ein Hinweis auf Unterschiede der beiden Substrate beim Export sein. Vielleicht benötigt FlgE ein Chaperon und FlgD nicht. Das Gen des möglichen Chaperons hätte dann im Testsystem mit exprimiert werden müssen. Bisher konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob FlgE ein Chaperon benötigt und welches von den bekannten flagellären Proteinen es dann sein könnte.

Von allen anderen möglichen fTTSS-Substraten wurde bisher nur beim Filamentprotein FliC eine mögliche Exportsignalsequenz untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die N-terminalen 13 AS für den Transport nicht essentiell sind. Laut Végh *et al.* (2006) liegt das Exportsignal für FliC N-terminal im Bereich der AS 26 bis 47. Da im Gegensatz dazu die ersten N-terminalen AS in FlgD für den Export nötig sind, gibt es anscheinend Unterschiede bei der Lage des Signals zwischen FliC als Substrat des Filamenttyps und FlgD als Substrat des Stab- und Hakentyps.

4.8 DAS EXPORTSIGNAL VON FLGD HAT PROTEINCHARAKTER

Weitere bereits unter Weber-Sparenberg *et al.* (2006) publizierte Untersuchungen über die Beschaffenheit des Exportsignals von FlgD, lassen vermuten, dass das Exportsignal von FlgD Proteincharakter hat und nicht auf mRNA-Ebene definiert ist. Bei der Einführung von Rasterschubmutationen wurde die Aminosäuresequenz nach dem initialen Methionin im Bereich der ersten 8, 10 oder 20 AS komplett verändert, wobei die Nukleotidsequenz fast unverändert blieb. Diese Veränderungen auf Aminosäureebene

hatten einen stark reduzierten Export von FlgDPhoA zur Folge. Im Gegensatz dazu wurden stille Mutationen im Bereich der Codons 2 bis 10, d. h. eine Veränderung der Nukleotidsequenz ohne Veränderung der Aminosäuresequenz, toleriert (Abbildung 4.4).

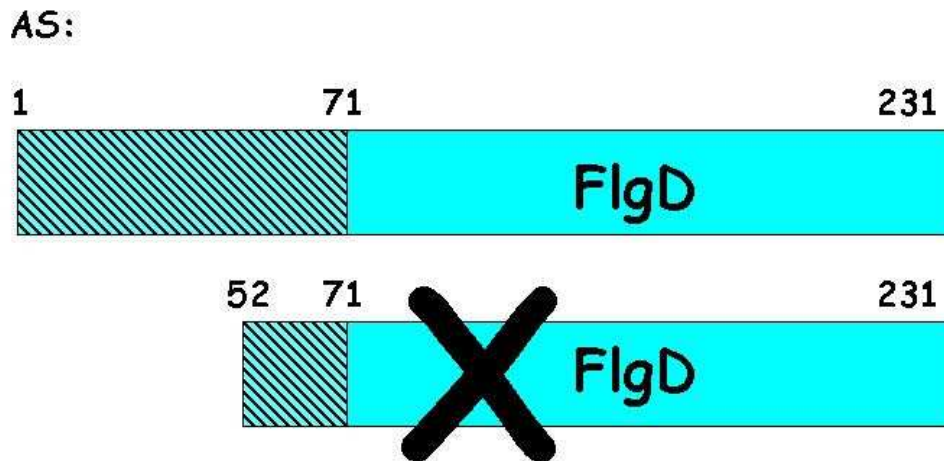


ABBILDUNG 4.3:

Signalsequenz von FlgD für den Export mit Hilfe des fTTSS.

Beim Hakenkappenprotein FlgD in seiner gesamten Länge von AS 1 bis 231 ist die Signalsequenz (schwarz schraffiert) innerhalb der N-terminalen 71 AS lokalisiert. Diese 71 AS sind für den Export von FlgD durch das fTTSS essentiell. Innerhalb dieses Proteinabschnittes muss die Erkennung für den Export erfolgen. TTSS-Substrate wie YplA aus *Y. enterocolitica* benötigen ein Signal von nur 20 AS für den Transport (Warren und Young, 2005). Das würde einem FlgD entsprechen, das erst mit dem zweiten Startcodon an Position 52 beginnt. FlgD mit einer Länge von AS 52 bis 231 wird jedoch nicht mit Hilfe des fTTSS exportiert.

Was die Yop-Proteine in *Y. enterocolitica* betrifft wurde das Exportsignal bisher kontrovers diskutiert. Gemäß Anderson und Schneewind (1997 und 1999) ist das Exportsignal von YopE, YopN und YopQ auch aufgrund von Untersuchungsansätzen wie Rasterschubmutationen und stille Mutationen auf der Ebene der mRNA zu finden, wobei Ramamurthi und Schneewind (2005) nach weiteren Untersuchungen auch einräumen, dass beide Strukturen von Bedeutung sein können. Gemäß Lloyd *et al.* (2001b und 2002) ist das Exportsignal zumindest von YopE auf Aminosäureebene zu finden. Gleiches gilt auch für SopE aus *S. typhimurium* (Karavolos *et al.*, 2005).

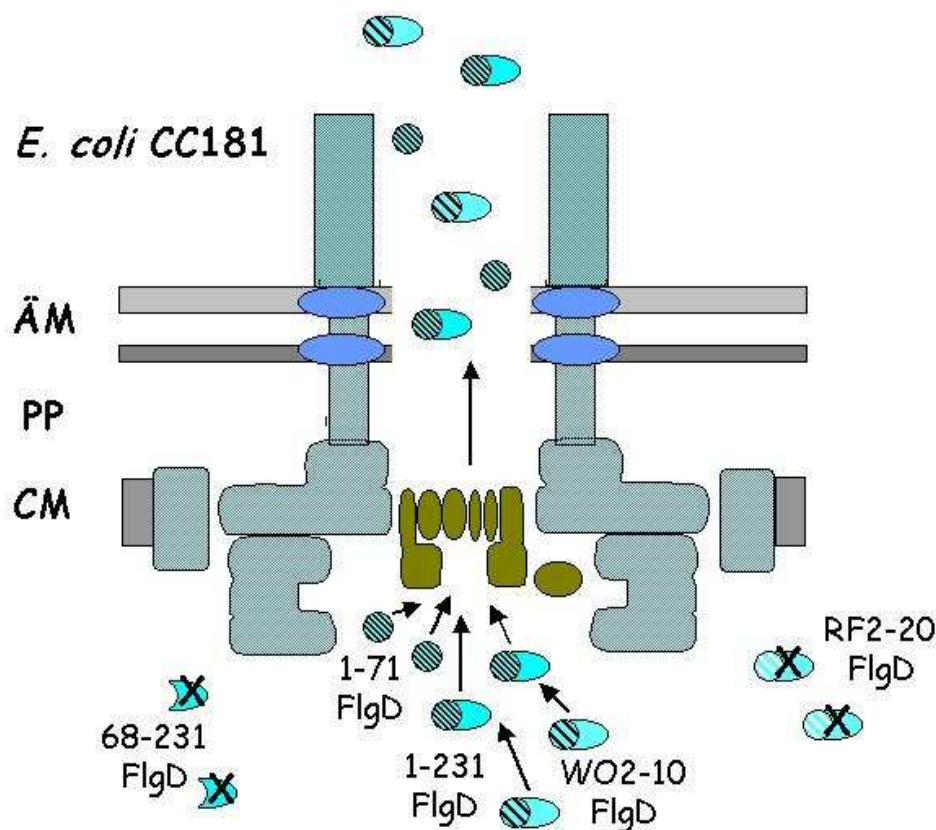


ABBILDUNG 4.4:

Substraterkennung und Export durch das fTTSS am Beispiel des Signaltbereichs von FlgD in *E. coli* CC181.

Das Signal für die Erkennung (schwarz schraffiert) durch das fTTSS ist bei FlgD auf Aminosäureebene innerhalb der N-terminalen 71 Aminosäuren lokalisiert. Entsprechend wird FlgD in seiner ganzen Länge (1-231FlgD) vom flagellären Exportapparat erkannt und durch den inneren Kanal des wachsenden Flagellums an seinen Bestimmungsort transportiert. Auch ein Protein, das nur aus dem Signalsequenzbereich allein besteht (1-71FlgD) kann exportiert werden. Fehlt ein Teil des Signals in FlgD (68-231FlgD) wird das Protein nicht über die Membran transportiert. Bei einer veränderten Nukleotid-, jedoch unveränderten Aminosäuresequenz im Signaltbereich (schwarz, grob schraffiert, WO2-10FlgD) erfolgt Export durch das fTTSS. Wird umgekehrt die Nukleotidsequenz beibehalten und die Aminosäuresequenz des Signals von FlgD zerstört (weiß, grob schraffiert, RF2-20 FlgD), wird das Protein nicht transportiert (ÄM = Äußere Membran, IM = Innere Membran, PP = Periplasma).

Wenn das Exportsignal von FlgD tatsächlich Proteincharakter hat, obwohl keine gemeinsame Konsensussequenz unter den Substraten gefunden werden konnte, erfolgt die Erkennung der Substrate durch den Exportapparat wahrscheinlich nicht über die Primärsequenz. Der Ersatz der N-terminalen Verkürzung in 9-231FlgDPhoA durch eine alternierende Sequenz von Serin und Isoleucin machte das Hybridprotein wieder

transportierbar. Da solch eine amphipathische Sequenz den Export beeinflussen kann, scheinen physikochemische Eigenschaften im Signalbereich bei der Erkennung eine Rolle zu spielen. Auch bei YopE sind solche physikochemischen Eigenschaften der N-terminalen Aminosäuresequenz wichtig (Lloyd *et al.*, 2001b). Im Gegensatz dazu sind im N-terminalen Bereich von nativem FlgD jedoch eher polare AS zu finden. Es kann deshalb nur spekuliert werden, ob das Signal in einer höheren Strukturordnung des Proteinbereichs zu finden ist. Insgesamt haben die Untersuchungen jedoch ergeben, dass das Exportsignal bei FlgD innerhalb der 71 N-terminalen AS auf Proteinebene zu finden ist. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass auch die mRNA und Chaperone beim Exportprozess involviert sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Assemblierung des bakteriellen Flagellums müssen die externen Untereinheiten an ihren Bestimmungsort transportiert werden. Dies geschieht wie bei allen Gram-negativen Bakterien auch in *Escherichia coli* mit Hilfe des flagellären Typ III-Sekretionssystems (fTTSS). Dabei ist der flagelläre Exportapparat mit seinen cytoplasmatischen Komponenten FliH, FliI und FliJ von Bedeutung. Der Exportapparat ist im Basalkörper des Flagellums lokalisiert und liefert die Energie für den Export der Substrate, wie z. B. das Hakenkappenprotein FlgD und das Hakenprotein FlgE. Die Substrate benötigen ihrerseits ein Signal für die Erkennung durch den Exportapparat.

Typ III-Sekretionssysteme (TTSS) sind neben der Flagellenbiogenese für die Injektion von bakteriellen Effektorproteinen in eukaryotische Wirtszellen essentiell. Mit einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen des Sekretionsprozesses können Erkenntnisse zum Transportvorgang der Substrate zur Flagellenassemblierung gewonnen werden und aufgrund der engen Verwandtschaft zum TTSS in Injektisomen auch Hinweise auf deren Funktionsweise bringen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Interaktionen zwischen löslichen Komponenten des flagellären Typ III-Sekretionssystems von *E. coli* K12 festgestellt werden. Dabei handelte es sich um Interaktionen zwischen den cytoplasmatischen Komponenten des flagellären Exportapparates FliH, FliI und FliJ. Zudem wurden begonnene Arbeiten zur Lokalisation und Beschaffenheit einer Erkennungssequenz für den Exportapparat beim Substrat FlgD weitergeführt und auch das Substrat FlgE näher untersucht. Im Detail konnten folgende Untersuchungen durchgeführt bzw. Funktionsweisen ermittelt werden:

1. Durch die Herstellung von fTTSS-spezifischen Deletionsmutanten von *E. coli* CC181 sowie die Klonierung von Genen des flagellären Exportapparates in die pASK-IBA-Vektoren konnte ein plasmidabhängiges Komplementationssystem etabliert und innerhalb dieses Systems die Funktionalität der rekombinanten Proteine überprüft werden.
2. Ein Komplex, bestehend aus FliH, FliI und FliJ, konnte präpariert werden. Dafür wurden die Gene *fliH*, *fliI* und *fliJ* zusammen in den Vektor pASK-IBA 45 kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die synthetisierten Proteine FliH, FliI und FliJ wurden dann zusammen durch Affinitätschromatographie aus dem Cytosol der Zellen präpariert und mittels Westernblot und MALDI-TOF analysiert.

3. FliH, FliI und FliJ konnten über die entsprechenden Gene in den pASK-IBA-Vektoren individuell in *E. coli* BL21 (DE3) synthetisiert und dann aus dem Cytosol der Zellen mit Hilfe der Affinitätschromatographie und der Gelfiltration angereichert werden. Die präparierten Proteine wurden dann für Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt.
4. Interaktionen und Affinitäten zwischen den zuvor einzeln präparierten FliH, FliI und FliJ konnten mit Hilfe von isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) und Surface Plasmon Resonance (SPR) ermittelt werden. Die ITC lieferte thermodynamische Parameter für die FliJ-FliH-Interaktion. Mit Hilfe der SPR wurden kinetische Daten der FliI-FliH- und der FliI-FliJ-Interaktion bestimmt.
5. Mittels eines Testsystems für das fTTSS in *E. coli* CC181-Mutanten, bei denen die Gene zur Synthese des Flagellenstabs fehlten, konnte der Export des Hybridproteins FlgDPhoA ins Periplasma untersucht werden. Dabei wurden von FlgD auch N- oder C-terminale Verkürzungen sowie auf Nukleotid- oder Aminosäureebene veränderte Sequenzen eingesetzt. Die Untersuchungen ergaben ein Signal für den Export des Hakenkappenproteins FlgD auf Proteinebene und nicht auf der Ebene der mRNA. Zudem konnte das Exportsignal auf die N-terminalen 71 Aminosäuren von FlgD eingegrenzt und eine Bedeutung des möglichen zweiten Startcodons an Position 52 in *flgD* für den Export ausgeschlossen werden.
6. Bei den Untersuchungen von FlgEPhoA-Hybridproteinen im oben genannten Testsystem konnte das Hakenprotein FlgE in seiner gesamten Länge vom fTTSS ins Periplasma transportiert werden. Im Gegensatz zu FlgD führten jedoch alle C-terminalen Verkürzungen von FlgE zum Transportverlust.

6. LITERATUR

Aizawa, S.-I. (2001): Bacterial Flagella and Type III Secretion Systems, FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, **202**: 157-164

Aldridge, P.; Hughes, K. T. (2001): How and when Are Substrates Selected for Type III Secretion?, TRENDS IN MICROBIOLOGY, **9 (5)**: 209-214

Anderson, D. M.; Schneewind, O. (1997): A mRNA Signal for the Type III Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*, SCIENCE, **278**: 1140-1143

Anderson, D. M.; Schneewind, O. (1999): *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion: An mRNA Signal that Couples Translation and Secretion of YopQ, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **31 (4)**: 1139-1148

Auvray, F.; Ozin, A. J.; Claret, L.; Hughes, C. (2002): Intrinsic Membrane Targeting of the Flagellar Export Aptness FliI: Interaction with Acidic Phospholipids and FliH, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **318**: 941-950

Auvray, F.; Thomas, J.; Fraser, G. M.; Hughes, C. (2001): Flagellin Polymerisation Control by a Cytosolic Export Chaperone, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **308**: 221-229

Bennett, J. C. Q.; Hughes, C. (2000): From Flagellum Assembly to Virulence: The Extended Family of Type III Export Chaperones, TRENDS IN MICROBIOLOGY, **8 (5)**: 202-204

Bennett, J. C. Q.; Thomas, J.; Fraser, G. M.; Hughes, C. (2002): Substrate Complexes and Domain Organization of the *Salmonella* Flagellar Export Chaperones FlgN and FliT, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **39 (3)**: 781-791

Berg, H. C. (1975): How Bacteria Swim, SCIENTIFIC AMERICAN, **233**: 36-44

Blair, D. F. (2003): Flagellar Movement Driven by Proton Translocation, FEBS LETTERS, **545**: 86-95

Blocker, A.; Komoriya, K.; Aizawa, S.-I. (2003): Type III Secretion Systems and Bacterial Flagella: Insights into their Function from Structural Similarities, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **100 (6)**: 3027-3030

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987): Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels, ELECTROPHORESIS, **8 (2)**: 93-99

Bonifield, H. R.; Yamaguchi, S.; Hughes, K. T. (2000): The Flagellar Hook Protein, FlgE, of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Posttranscriptionally Regulated in Response to the Stage of Flagellar Assembly, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **182 (14)**: 4044-4050

Boyd, A. P.; Lambermont, I.; Cornelis, G. R. (2000): Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for Delivery into Eukaryotic Cells: Role of the SycE Chaperone Binding Domain of YopE, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **182 (17):** 4811-4821

Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, **72:** 248-254

Büttner, D.; Bonas, U. (2002): Port of Entry – the Type III Secretion Translocon, TRENDS IN MICROBIOLOGY, **10 (4):** 186-192

Calamia, J.; Manoil, C. (1990): *lac* Permease of *Escherichia coli*: Topology and Sequence Elements Promoting Membrane Insertion, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **87:** 4811-4821

Claret, L.; Calder, S. R.; Higgins, M.; Hughes, C. (2003): Oligomerization and Activation of the FliI ATPase Central to Bacterial Flagellum Assembly, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **48 (5):** 1349-1355

Cornelis, G. R. (2002): The *Yersinia* Ysc-Yop “Type III” Weaponry, NATURE REVIEWS, **3:** 742-752

Cornelis, G. R. (2006): The Type III Secretion Injectisome, NATURE REVIEWS, **4:** 811-825

Cornelis, G. R.; Gijsegem, F. Van (2000): Assembly and Function of Type III Secretory Systems, ANNUAL REVIEWS MICROBIOLOGY, **54:** 735-774

Daily, F. E.; Macnab, R. M. (2002): Effects of Lipoprotein Biogenesis Mutations on Flagellar Assembly in *Salmonella*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **184 (3):** 771-776

Datsenko, K. A.; Wanner, B. L. (2000): One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **97 (12):** 6640-6645

Diószeghy, Z.; Závodszy, P.; Namba, K.; Vonderviszt, F. (2004): Stabilization of Flagellar Filaments by HAP2 Capping, FEBS LETTERS, **568:** 105-109

Dreyfus, G.; Williams, A. W.; Kawagishi, I.; Macnab, R. M. (1993): Genetic and Biochemical Analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a Flagellar Protein Related to the Catalytic Subunit of the F₀F₁ ATPase and to Virulence Proteins of Mammalian and Plant Pathogens, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **175 (10):** 3131-3138

Evans, L. D. B.; Stafford, G. P.; Ahmed, S.; Fraser, G. M.; Hughes, C. (2006): An Escort Mechanism for Cycling of Export Chaperones during Flagellum Assembly, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **103 (46):** 17474-17479

Fan, F.; Macnab, R. M. (1996): Enzymatic Characterization of FliI, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, **271 (50):** 31981-31988

Fan, F.; Ohnishi, K.; Francis, N. R.; Macnab, R. M. (1997): The FliP and FliR Proteins of *Salmonella typhimurium*, Putative Components of the Type III Flagellar Export Apparatus, Are Located in the Flagellar Basal Body, *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, **26 (5)**: 1035-1046

Feldman, M. F.; Cornelis, G. R. (2003): The Multitalented Type III Chaperones: All You Can Do with 15 kDa, *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*, **219**: 151-158

Ferris, H. U.; Furukawa, Y.; Minamino, T.; Kroetz, M. B.; Kihara, M.; Namba, K.; Macnab, R. M. (2005): FlhB Regulates Ordered Export of Flagellar Components via Autocleavage Mechanism, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **280 (50)**: 41236-41242

Fraser, G. M.; Bennett, J. C. Q.; Hughes, C. (1999): Substrate-Specific Binding of Hook-Associated Proteins by FlgN and FliT, Putative Chaperones for Flagellum Assembly, *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, **32 (3)**: 569-580

Fraser, G. M.; González-Pedrajo, B.; Tame, J. R. H.; Macnab, R. M. (2003a): Interactions of FliJ with the *Salmonella* Type III Flagellar Export Apparatus, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **185 (18)**: 5546-5554

Fraser, G. M.; Hirano, T.; Ferris, H. U.; Devgan, L. L.; Kihara, M.; Macnab, R. M. (2003b): Substrate Specificity of Type III Flagellar Protein Export in *Salmonella* is Controlled by Subdomain Interactions in FlhB, *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, **48 (4)**: 1043-1057

Fu, Y.; Galán, J. E. (1998): Identification of a Specific Chaperone for SptP, a Substrate of the Centisome 63 Type III Secretion System, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **180 (13)**: 3393-3399

Galán, J. E.; Collmer, A. (1999): Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells, *SCIENCE*, **284**: 1322-1328

Ghosh, P. (2004): Process of Protein Transport by the Type III Secretion System, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, **68 (4)**: 771-795

González-Pedrajo, B.; Fraser, G. M.; Minamino, T.; Macnab, R. M. (2002): Molecular Dissection of *Salmonella* FliH, a Regulator of the ATPase FliI and the Type III Flagellar Protein Export Pathway, *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, **45 (4)**: 967-982

González-Pedrajo, B.; Minamino, T.; Kihara, M.; Namba, K. (2006): Interactions between C Ring Proteins and Export Apparatus Components: A Possible Mechanism for Facilitating Type III Protein Export, *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, **60 (4)**: 984-998

He, S. Y.; Nomura, K.; Whittam, T. S. (2004): Type III Protein Secretion Mechanism in Mammalian and Plant Pathogens, *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, **1694**: 181-206

Henkel, R. D.; VandeBerg, J. L.; Walsh, R. A. (1988): A Microassay for ATPase, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, **169**: 312-318

Herring, C. D.; Glasner, J. D.; Blattner, F. R. (2003): Gene Replacement without Selection: Regulated Suppression of Amber Mutations in *Escherichia coli*, *GENE*, **331**: 153-163

Hirano, T.; Minamino, T.; Macnab, R. M. (2001): The Role in Flagellar Rod Assembly of the N-Terminal Domain of *Salmonella* FlgJ, a Flagellum-Specific Muramidase, *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, **312**: 359-369

Hirano, T.; Minamino, T.; Namba, K.; Macnab, R. M. (2003): Substrate Specific Classes and the Recognition Signal for *Salmonella* Type III Flagellar Export, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **185 (8)**: 2485-2492

Hueck, C. J. (1998): Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, **62 (2)**: 379-433

Imada, K.; Minamino, T.; Tahara, A.; Namba, K. (2007): Structural Similarity between the Flagellar Type III ATPase FliI and F₁-ATPase Subunits, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA*, **104 (2)**: 485-490

Jung, H.; Rübenhagen, R.; Tebbe, S.; Leifker, K.; Tholema, N.; Quick, M.; Schmid, R. (1998): Topology of the Na⁺/Proline Transporter of *Escherichia coli*, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **273 (41)**: 26400-26407

Kalir, S.; McClure, J.; Pabbaraju, K.; Southward, C.; Ronen, M.; Leibler, S.; Surette, M. G.; Alon, U. (2001): Ordering Genes in a Flagella Pathway by Analysis of Expression Kinetics from Living Bacteria, *SCIENCE*, **292**: 20080-2083

Karavalos, M. H.; Wilson, M.; Henderson, J.; Lee, J. J.; Khan, C. M. A. (2005): Type III Secretion of the *Salmonella* Effector Protein SopE Is Mediated via an N-Terminal Amino Acid Signal and Not an mRNA Sequence, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **187 (5)**: 1559-1567

Karlinsey, J. E.; Lonner, J.; Brown, K. L.; Hughes, K. T. (2000): Translation/Secretion Coupling by Type III Secretion Systems, *CELL*, **102**: 486-497

Karlsson, R.; Katsamba, P. S.; Nordin, H.; Pol, E.; Myszka, D. G. (2005): Analyzing a Kinetic Titration Series Using Affinity Biosensors, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, **349 (1)**: 136-147

Kihara, M.; Miller, G. U.; Macnab, R. M. (2000): Deletion Analysis of the Flagellar Switch Protein FliG of *Salmonella*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **182 (11)**: 3022-3028

Kihara, M.; Minamino, T.; Yamaguchi, S.; Macnab, R. M. (2001): Intergenic Suppression between the Flagellar MS Ring Protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a Membrane Component of Its Export Apparatus, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **183 (5)**: 1655-1662

- Konkel, M. E.; Klena, J. D., Rivera-Amill, V.; Monteville, M. R.; Biswas, D.; Raphael, B.; Mickelson, J. (2004):** Secretion of Virulence Proteins from *Camylobacter jejuni* Is Dependent on a Functional Flagellar Export Apparatus, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **186** (11): 3296-3303
- Kostyukova, A. S.; Pyatibratov, M. G.; Filimonov, V. V.; Fedorov, O. V. (1988):** Flagellin Parts Acquiring a Regular Structure during Polymerization Are Disposed on the Molecule Ends, FEBS LETTERS, **241** (1, 2): 141-144
- Kubori, T.; Matsushima, Y.; Nakamura, D.; Uralil, J.; Lara-Tejero, M.; Sukhan, A.; Galán, J. E.; Aizawa, S.-I. (1998):** Supramolecular Structure of the *Salmonella typhimurium* Type III Protein Secretion System; SCIENCE, **280**: 602-605
- Kubori, T.; Yamaguchi, S.; Aizawa, S.-I. (1997):** Assembly of the Switch Complex onto the MS Ring Complex of *Salmonella typhimurium* Does Not Require Any Other Flagellar Proteins, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **179** (3): 813-817
- Kutsukake, K.; Doi, H. (1994):** Nucleotid Sequence of the *flgD* Gene of *Salmonella typhimurium* which Is Essential for Flagellar Hook Formation, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, **1218**: 443-446
- Kuwajima, G.; Kawadishi, I.; Homma, M.; Asaka, J.-I.; Kondo, E.; Macnab, R. M. (1989):** Export of an N-Terminal Fragment of *Escherichia coli* Flagellin by a Flagellum-Specific Pathway, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **86**: 4953-4957
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head Bacteriophage T4, NATURE, **227**: 680-685
- Lee, S. H.; Galán, J. E. (2003):** InvB Is a Type III Secretion-Associated Chaperone for the *Salmonella enterica* Effector Protein SopE, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **185** (24): 7279-7284
- Lloyd, S. A.; Forsberg, A.; Wolf-Watz, H.; Francis, W. S. (2001a):** Targeting Exported Substrates to the *Yersinia* TTSS: Different Functions for Different Signals?, TRENDS IN MICROBIOLOGY, **9** (8): 367-371
- Lloyd, S. A.; Norman, M.; Rosqvist, R.; Wolf-Watz, H. (2001b):** *Yersinia* YopE Is Targeted for Type III Secretion by N-Terminal, not mRNA, Signals, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **39** (2): 520-531
- Lloyd, S. A.; Sjöström, M.; Andersson, S.; Wolf-Watz, H. (2002):** Molecular Characterization of Type III Secretion Signals via Analysis of Synthetic N-Terminal Amino Acid Sequences, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **43** (1): 51-59
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951):** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, **19**: 265-275

Macnab, R. M. (1996): Flagella and Motility, in: Neidhardt, F. C. (Editor), *Escherichia coli* and *Salmonella*, CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY, 2nd Edition, ASM Press, Washington, D. C.: 123-145

Macnab, R. M. (1999): The Bacterial Flagellum: Reversible Rotary Propellor and Type III Export Apparatus, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **181 (23):** 7149-7153

Macnab, R. M. (2000): Action at a Distance – Bacterial Flagellar Assembly, SCIENCE, **290 (5499):** 2086-2087

Macnab, R. M. (2003): How Bacteria Assemble Flagella, ANNUAL REVIEWS MICROBIOLOGY, **57:** 77-100

Macnab, R. M. (2004): Type III Flagellar Protein Export and Flagellar Assembly, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, **1694:** 207-217

Majander, K.; Anton, L.; Antikainen, J.; Lång, H.; Brummer, M.; Korhonen, T. K.; Westerlund-Wikström, B. (2005): Extracellular Secretion of Polypeptides Using a Modified *Escherichia coli* Flagellar Secretion Apparatus, NATURE BIOTECHNOLOGY, **23 (4):** 475-481

Makishima, S.; Komoriya, K.; Yamaguchi, S.; Aizawa, S.-I. (2001): Length of the Flagellar Hook and the Capacity of the Type III Export Apparatus, SCIENCE, **291:** 2411-2413

Manson, M. D.; Armitage, J. P. ; Hoch, J. A.; Macnab, R. M. (1998): Bacterial Locomotion and Signal Transduction, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **180 (5):** 1009-1022

Marlovits, T. C.; Kubori, T.; Sukhan, A.; Thomas, D. R.; Galán, J. E.; Unger, V. M. (2004): Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex, SCIENCE, **306:** 1040-1042

McMurry, J. L.; Arnam, J. S. Van; Kihara, M.; Macnab, R. M. (2004): Analysis of the Cytoplasmic Domains of *Salmonella* FlhA and Interactions with Components of the Flagellar Export Machinery, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **186 (22):** 7586-7592

McMurry, J. L.; Murphy, J. W.; Gonzáles-Pedrajo, B. (2006): The FliN-FliH Interaction Mediates Localization of Flagellar Export ATPase FliI to the C Ring Complex, BIOCHEMISTRY, **45:** 11790-11798

Michaelis, S.; Inouye, H.; Oliver, D.; Beckwith (1983): Mutations That Alter the Signal Sequence of Alkaline Phosphatase in *Escherichia coli*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **154 (1):** 366-374

Mimori-Kiyosue, Y.; Vonderviszt, F.; Yamashita, I.; Fujiyoshi, Y.; Namba, K. (1996): Direct Interaction of Flagellin Termini Essential for Polymorphic Ability of Flagellar Filament, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **93:** 15108-15113

Minamino, T.; Chu, R.; Yamaguchi, S.; Macnab, R. M. (2000a): Role of FliJ in Flagellar Protein Export in *Salmonella*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **182 (15):** 4207-4215

Minamino, T.; Doi, H.; Kutsukake, K. (1999a): Substrate Specificity Switching of the Flagellum-Specific Export Apparatus during Flagellar Morphogenesis in *Salmonella typhimurium*, BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, **63 (7):** 1301-1303

Minamino, T.; González-Pedrajo, B.; Kihara, M.; Namba, K.; Macnab, R. M. (2003): The ATPase FliI Can Interact with the Type III Flagellar Protein Export Apparatus in the Absence of its Regulator, FliH, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **185 (13):** 3983-3988

Minamino, T.; González-Pedrajo, B.; Oosawa, K.; Namba, K.; Macnab, R. M. (2002): Structural Properties of FliH, an ATPase Regulatory Component of the *Salmonella* Type III Flagellar Export Apparatus, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **322:** 281-290

Minamino, T.; González-Pedrajo, B.; Yamaguchi, K.; Aizawa, S.-I.; Macnab, R. M. (1999b): FliK, the Protein Responsible for Flagellar Hook Length Control in *Salmonella*, Is Exported During Hook Assembly, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **34 (2):** 295-304

Minamino, T.; Iino, T.; Kutsukake, K. (1994): Molecular Characterization of the *Salmonella typhimurium flhB* Operon and Its Protein Products, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **176 (24):** 7630-7637

Minamino, T.; Imada, K.; Tahara, A.; Kihara, M.; Macnab, R. M.; Namba, K. (2006a): Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of *Salmonella* FliI, the ATPase Component of the Type III Flagellar Protein-Export Apparatus, ACTA CRYSTALLOGRAPHICA, **F62:** 973-975

Minamino, T.; Kazetani, K.-i.; Tahara, A.; Suzuki, H.; Furukawa, Y.; Kihara, M.; Namba, K. (2006b): Oligomerization of the Bacterial Flagellar ATPase FliI Is Controlled by its Extreme N-Terminal Region, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **360:** 510-519

Minamino, T.; Macnab, R. M. (1999): Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **181 (5):** 1388-1394

Minamino, T.; Macnab, R. M. (2000a): Interactions among Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus and Its Substrates, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **35 (5):** 1052-1064

Minamino, T.; Macnab, R. M. (2000b): Domain Structure of *Salmonella* FlhB, a Flagellar Export Component Responsible for Substrate Specificity Switching, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **182 (17):** 4906-4914

Minamino, T.; Macnab, R. M. (2000c): FliH, a Soluble Component of the Type III Flagellar Export Apparatus of *Salmonella*, Forms a Complex with FliI and Inhibits Its ATPase Activity, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **37 (6):** 1494-1503

Minamino, T.; Namba, K. (2004): Self-Assembly and Type III Protein Export of the Bacterial Flagellum, JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, **7**: 5-17

Minamino, T.; Saijo-Hamano, Y.; Furukawa, Y.; González-Pedrajo, B.; Macnab, R. M.; Namba, K. (2004): Domain Organization and Function of *Salmonella* FliK, a Flagellar Hook-Length Control Protein, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **341**: 491-502

Minamino, T.; Tame, J. R. H.; Namba, K.; Macnab, R. M. (2001): Proteolytic Analysis of the FliH/FliI Complex, the ATPase Component of the Type III Flagellar Export Apparatus of *Salmonella*, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **312**: 1027-1036

Minamino, T.; Yamaguchi, S.; Macnab, R. M. (2000b): Interaction between FliE and FlgB, a Proximal Rod Component of the Flagellar Basal Body of *Salmonella*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **182** (11): 3029-3036

Miroux, B.; Walker J. E. (1996): Over-Production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **260**: 289-298

Moriya, N.; Minamino, T.; Hughes, K. T.; Macnab, R. M.; Namba, K. (2006): The Type III Flagellar Export Specificity Switch Is Dependent on FliK Ruler and a Molecular Clock, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **359**: 466-477

Mota, L. J.; Sorg, I.; Cornelis, G. R. (2005): Type III Secretion: The Bacteria-Eukaryotic Cell Express, FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, **252**: 1-10

Müller, S. A.; Pozidis, C.; Stone, R.; Meesters, C.; Chami, M.; Engel, A.; Economou, A.; Stahlberg, H. (2006): Double Hexameric Ring Assembly of the Type III Protein Translocase ATPase HrcN, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **61** (1): 119-125

Muramoto, K.; Macnab, R. M. (1998): Deletion Analysis of MotA and MotB, Components of the Force-Generating Unit in the Flagellar Motor of *Salmonella*, MOLECULAR MICROBIOLOGY, **29** (5): 1191-1202

Muramoto, K.; Makishima, S.; Aizawa, S.-I.; Macnab, R. M. (1998): Effect of Cellular Level of FliK on Flagellar Hook and Filament Assembly in *Salmonella typhimurium*, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **277**: 871-882

Muramoto, K.; Makishima, S.; Aizawa, S.-I.; Macnab, R. M. (1999): Effect of Hook Subunit Concentration on Assembly and Control of Length of the Flagellar Hook of *Salmonella*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **181** (18): 5808-5813

Muskotál, A.; Király, R.; Sebestyén, A.; Gugolya, Z.; Végh, B. M.; Vonderviszt, F. (2006): Interaction of FliS Flagellar Chaperone with Flagellin, FEBS Letters, **580**: 3916-3920

Nambu, T.; Minamino, T.; Macnab, R. M.; Kutsukake, K. (1999): Peptidoglycan-Hydrolyzing Activity of the FlgJ Protein, Essential for Flagellar Rod Formation in *Salmonella typhimurium*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **181** (5): 1555-1561

Ohnishi, K.; Fan, F.; Schoenhals, G. J.; Kihara, M.; Macnab, R. M. (1997): The FliO, FliP, FliQ, and FliR Proteins of *Salmonella typhimurium*: Putative Components for Flagellar Assembly, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **179 (19)**: 6092-6099

Ohnishi, K.; Ohto, Y.; Aizawa, S.-I., Macnab, R. M.; Iino, T. (1994): FlgD Is a Scaffolding Protein Needed for Flagellar Hook Assembly in *Salmonella typhimurium*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **176 (8)**: 2272-2281

Ozin, A. J.; Claret, L.; Auvray, F.; Hughes, C. (2003): The FliS Chaperone Selectively Binds the Disordered Flagellin C-Terminal D0 Domain Central to Polymerisation, FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, **219**: 219-224

Pallen, M. J.; Matzke, N. J. (2006): From the Origin of Species to the Origin of Bacterial Flagella, NATURE REVIEWS, **4**: 784-790

Pallen, M. J.; Penn, C. W.; Chaudhuri, R. R. (2005): Bacterial Flagellar Diversity in the Post-Genomic Era, TRENDS IN MICROBIOLOGY, **13 (4)**: 143-149

Papalia, G. A.; Baer, M.; Luehrsen, K.; Nordin, H.; Flynn, P.; Myszka, D. G. (2006): High-Resolution Characterization of Antibody Fragment/Antigen Interactions Using Biacore T100, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, **358**: 112-119

Parsot, C.; Hamiaux, C.; Page, A.-L. (2003): The Various and Varying Roles of Specific Chaperones in Type III Secretion Systems, CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, **6**: 7-14

Paul, K.; Harmon, J. G.; Blair, D. F. (2006): Mutational Analysis of the Flagellar Rotor Protein FliN: Identification of Surfaces Important for Flagellar Assembly and Switching JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **188 (14)**: 5240-5248

Pozidis, C.; Chalkiadaki, A.; Gomez-Serrano, A.; Stahlberg, H.; Brown, I.; Tampakaki, A. P.; Lustig, A.; Sianidis, G.; Politou, A. S.; Engel, A.; Panopoulos, N. J.; Mansfield, J.; Pugsley, A. P.; Karamanou, S.; Economou, A. (2003): Type III Protein Translocase: HrcN Is a Peripheral Membrane ATPase that Is Activated by Oligomerization, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, **278 (28)**: 25816-25824

Pradel, N.; Decorps, A.; Ye, C.; Santini, C.-L.; Wu, L.-F. (2005): YidC-Dependent Translocation of Green Fluorescence Protein Fused to the FliP Cleavable Signal Peptide, BIOCHIMIE, **87**: 191-196

Ramamurthi, K. S.; Schneewind, O. (2005): A Synonymous Mutation in *Yersinia enterocolitica yopE* Affects the Function of the YopE Type III Secretion Signal, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **187 (2)**: 707-715

Rosu, V.; Chevance, F. F. V.; Karlinsey, J. E.; Hirano, T.; Hughes, K. T. (2006): Translation Inhibition of the *Salmonella fliC* Gene by the *fliC* 5' Untranslated Region, *fliC* Coding Sequences, and FlgM, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **188 (12)**: 4497-4507

Saijo-Hamano, Y.; Minamino, T.; Macnab, R. M.; Namba, K. (2004a): Structural and Functional Analysis of the C-Terminal Cytoplasmic Domain of FlhA, an Integral Membrane Component of the Type III Flagellar Protein Export Apparatus in *Salmonella*, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **343**: 457-466

Saijo-Hamano, Y.; Uchida, N.; Namba, K.; Oosawa, K. (2004b): In Vitro Characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, Flagellar Basal Body Proteins of *Salmonella*, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **339**: 423-435

Samatey, F. A.; Imada, K.; Nagashima, S.; Vonderviszt, F.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Namba, K. (2001): Structure of the Bacterial Flagellar Protofilament and Implications for a Switch for Supercoiling, NATURE, **410**: 331-337

Schoenhals, G. J.; Kihara, M.; Macnab, R. M. (1998): Translation of the Flagellar Gene *fliO* of *Salmonella typhimurium* from Putative Tandem Starts, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **180** (11): 2936-2942

Schuster, S. C.; Swanson, R. V.; Alex, L. A.; Bourret, R. B.; Simon, M. I. (1993): Assembly and Funktion of a Quarternary Signal Transduction Complex Monitored by Surface Plasmon Resonance, NATURE, **365**: 343-347

Shin, Y.-W.; Ryoo, K.-H.; Hong, K.-W.; Chang, K.-H.; Choi, J.-S.; So, M.; Kim, P.-K.; Park, J.-Y.; Bong, K.-T.; Kim, S.-H. (2007): Human Monoclonal Antibody against Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg), ANTIVIRAL RESEARCH, **75** (2): 113-120

Silva-Herzog, E.; Dreyfus, G. (1999): Interaction of FliI, a Component of the Flagellar Export Apparatus, with Flagellin and Hook Protein, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, **1431**: 374-383

Skerra, A.; Schmidt, G. M. (2000): Use of the Strep-Tag and Streptavidin for Detection and Purification of Recombinant Proteins, METHODS IN ENZMOLOGY, **326**: 271-304

Sottocasa, G. L.; Kuylenstierna, B.; Ernster, L.; Bergstran, A. (1967): Isocitrate Dehydrogenase, METHODS IN ENZMOLOGY, **10**: 448-463

Soutourina, O. A.; Bertin, P. N. (2003): Regulation Cascade of Flagellar Expression in Gram-Negative Bacteria, FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, **27**: 505-523

Stafford, G. P.; Ogi, T.; Hughes, C. (2005): Binding and Transcriptional Activation of Non-Flagellar Genes by the *Escherichia coli* Flagellar Master Regulator FlhD₂C₂, MICROBIOLOGY, **151**: 1779-1788

Tabor, S.; Richardson, C. C. (1985): A Bacteriophage T7 RNA Polymerase/Promotor System for Controlled Exclusive Expression of Specific Genes, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **82**: 1074-1078

Tang, Y.; Mernaugh, R.; Zeng, X. (2006): Nongeneration Protocol for Surface Plasmon Resonance: Study of High-Affinity Interaction with High-Density Biosensors, ANALYTICAL CHEMISTRY, **78** (6): 1841-1848

Thanassi, D. G.; Hultgren, S. J. (2000): Multiple Pathways Allow Protein Secretion across the Bacterial Outer Membrane, CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, **12**: 420-430

Thomas, J.; Stafford, G. P.; Hughes C. (2004): Docking of Cytosolic Chaperone-Substrate Complexes at the Membrane ATPase during Flagellar Type III Protein Export, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **101 (11):** 3945-3950

Toker, A. S.; Kihara, M.; Macnab, R. M. (1996): Deletion Analysis of the FliM Flagellar Switch Protein of *Salmonella typhimurium*, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **178 (24):** 7069-7079

Toker, A. S.; Macnab, R. M. (1997): Distinct Regions of Bacterial Flagellar Switch Protein FliM Interact with FliG, FliN and CheY, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, **273:** 623-634

Trutnau, H.-H. (2006): New Multi-Step Kinetics Using Common Affinity Biosensors Saves Time and Sample at Full Access to Kinetics and Concentration, JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, **124:** 191-195

Van Arnem, J. S.; McMurphy, J. L.; Kihara, M.; Macnab, R. M. (2004): Analysis of an Engineered *Salmonella* Flagellar Fusion Protein, FliR-FlhB, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **186 (8):** 2495-2498

Végh, B. M.; Gál, P.; Dobó, J.; Zádodszky, P.; Vonderviszt, F. (2006): Localization of the Flagellum-Specific Secretion Signal in *Salmonella* Flagellin, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, **345 (1):** 93-98

Vogler, A. P.; Homma, M.; Irikura, V. M.; Macnab, R. M. (1991): *Salmonella typhimurium* Mutants Defective in Flagellar Filament Regrowth and Sequence Similarity of FliI to F₀F₁, Vacuolar, and Archaeobacterial ATPase Subunits, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **173 (11):** 3564-3572

Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J. (1982): Distantly Related Sequences in the α - and β -Subunits of ATP Synthase, Myosin, Kinases and other ATP-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold, THE EMBO JOURNAL, **1 (8):** 945-951

Warren, S. M.; Young, G. M. (2005): An Amino-Terminal Secretion Signal Is Required for YplA Export by the Ysa, Ysc, and Flagellar Type III Secretion Systems of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **187 (17):** 6075-6083

Weber-Sparenberg, C.; Pöplau, P.; Brookmann, H.; Rochón, M.; Möckel, C.; Nietschke, M.; Jung, H. (2006): Characterization of the Type III Export Signal of the Flagellar Hook Scaffolding Protein FlgD of *Escherichia coli*, ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, **186:** 307-316

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985): Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, GENE, **33:** 103-119

Yonekura, K.; Maki, S.; Morgan, D. G.; DeRosier, D. J.; Vonderviszt, F.; Imada, K.; Namba, K. (2000): The Bacterial Flagellar Cap as the Rotary Promotor of Flagellin Self-Assembly, SCIENCE, **290:** 2148-2152

Young, G. M.; Schmiel, D. H.; Miller, V. L. (1999): A New Pathway for the Secretion of Virulence Factors by Bacteria: The Flagellar Export Apparatus Functions as a Protein-Secretion System, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, **96**: 6456-6461

Zhu, K.; Gonzáles-Pedrajo, B.; Macnab, R. M. (2002): Interactions among Membrane and Soluble Components of the Flagellar Export Apparatus of *Salmonella*, BIOCHEMISTRY, **41**: 9516-9524

7. ANHANG

7.1 ANHANG ZUR EINLEITUNG

TABELLE 7.1.1: Gene und Operi, involviert in Flagellierung, Motilität und Chemotaxis von *E. coli*. (nach Macnab, 1996 und www.ncbi.nlm.nih.gov)

Gen	Operon	Klasse	Region	Basenpaare
<i>cheA</i>	<i>motABcheAW</i>	3b	II	1965
<i>cheB</i>	<i>tartapcheRBYZ</i>	3b	II	1050
<i>cheR</i>	<i>tartapcheRBYZ</i>	3b	II	861
<i>cheW</i>	<i>motABcheAW</i>	3b	II	504
<i>cheY</i>	<i>tartapcheRBYZ</i>	3b	II	390
<i>cheZ</i>	<i>tartapcheRBYZ</i>	3b	II	645
<i>flgA</i>	<i>flgA/flgAMN</i>	2	I	660
<i>flgB</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	417
<i>flgC</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	405
<i>flgD</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	696
<i>flgE</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	1209
<i>flgF</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	756
<i>flgG</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	783
<i>flgH</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	699
<i>flgI</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	1098
<i>flgJ</i>	<i>flgBCDEFGHIJ</i>	2	I	942
<i>flgK</i>	<i>flgKL</i>	3a	I	1644
<i>flgL</i>	<i>flgKL</i>	3a	I	954
<i>flgM</i>	<i>flgAMN/flgMN</i>	2/3a	I	294
<i>flgN</i>	<i>flgAMN/flgMN</i>	2/3a	I	417
<i>flhA</i>	<i>flhBAE</i>	2	II	2079
<i>flhB</i>	<i>flhBAE</i>	2	II	1149
<i>flhC</i>	<i>flhDC</i>	1	II	579
<i>flhD</i>	<i>flhDC</i>	1	II	351
<i>flhE</i>	<i>flhBAE</i>	2	II	393
<i>fliA</i>	<i>fliA</i>	2	IIIa	720
<i>fliC</i>	<i>fliC</i>	3b	IIIa	1497
<i>fliD</i>	<i>fliDST</i>	3a	IIIa	1407
<i>fliE</i>	<i>fliE</i>	2	IIIb	315
<i>fliF</i>	<i>fliFGHIJK</i>	2	IIIb	1658
<i>fliG</i>	<i>fliFGHIJK</i>	2	IIIb	996
<i>fliH</i>	<i>fliFGHIJK</i>	2	IIIb	687
<i>fliI</i>	<i>fliFGHIJK</i>	2	IIIb	1374
<i>fliJ</i>	<i>fliFGHIJK</i>	2	IIIb	444
<i>fliK</i>	<i>fliFGHIJK</i>	2	IIIb	1128
<i>fliL</i>	<i>fliLMNOPQ</i>	2	IIIb	465
<i>fliM</i>	<i>fliLMNOPQ</i>	2	IIIb	1005
<i>fliN</i>	<i>fliLMNOPQ</i>	2	IIIb	414
<i>fliO</i>	<i>fliLMNOPQ</i>	2	IIIb	306
<i>fliP</i>	<i>fliLMNOPQ</i>	2	IIIb	738

Fortsetzung Tabelle 7.1.1				
Gen	Operon	Klasse	Region	Basenpaare
<i>fliQ</i>	<i>fliLMNOPQ</i>	2	IIIb	270
<i>fliR</i>	<i>fliR</i>	2	IIIb	786
<i>fliS</i>	<i>fliDST</i>	3a	IIIa	411
<i>fliT</i>	<i>fliDST</i>	3a	IIIa	366
<i>motA</i>	<i>motABcheAW</i>	3b	II	888
<i>motB</i>	<i>motABcheAW</i>	3b	II	927
<i>tap</i>	<i>tartapcheRBYZ</i>	3b	II	1608
<i>tar</i>	<i>tartapcheRBYZ</i>	3b	II	1662

TABELLE 7.1.2: Proteine, involviert in Flagellierung, Motilität und Chemotaxis von *E. coli*. (aktualisiert nach Macnab, 1996; Macnab, 2003; Pallen und Matzke, 2006 und ca.expasy.org)

Protein	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht [Da]	Isoelektrischer Punkt	Funktion und Lokalisation
CheA	654	71382	4,78	CheY/CheB-Kinase
CheB	349	37468	8,40	Chemorezeptor, Methylesterase
CheR	286	32849	9,24	Chemorezeptor, Methyltransferase
CheW	167	18084	4,31	positiver Regulator von CheA
CheY	129	13966	4,89	Regulator der Rotor-schaltung als CheY-P
CheZ	214	23976	4,44	CheY-Phosphatase
FlgA	219	23519	10,19	Chaperon für FlgI, P-Ring-Synthese
FlgB	138	15109	5,03	Stab, proximal
FlgC	134	13968	5,23	Stab, proximal
FlgD	231	23575	4,18	Hakenkappe
FlgE	402	41914	4,45	Haken
FlgF	251	25912	4,80	Stab, proximal
FlgG	260	27744	4,68	Stab, distal
FlgH	232	24615	7,87	L-Ring
FlgI	365	38169	9,33	P-Ring
FlgJ	313	34475	7,80	Stabkappe, Muramidase
FlgK	547	57799	4,47	1. Haken-Filament-verbindung (HAP1)
FlgL	317	34281	4,63	2. Haken-Filament-verbindung (HAP3)
FlgM	97	10341	5,30	Anti- σ -Faktor
FlgN	138	15867	6,41	Chaperon für FlgK und FlgL
FlhA	692	74842	5,76	Exportapparat (Membran)
FlhB	382	42237	9,67	Exportapparat (Membran), Substratspezifitätswechsel
FlhC	192	21566	8,45	positive Regulation der Klasse 2-Genexpression

Fortsetzung Tabelle 7.1.2				
Protein	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht [Da]	Isoelektrischer Punkt	Funktion und Lokalisation
FlhD	116	13316	6,50	positive Regulation der Klasse 2-Genexpression
FlhE	130	14059	10,25	
FliA	239	27521	5,20	σ^{28} -Faktor für Klasse 3-Genexpression
FliC	498	51163	4,50	Filament (Flagellin)
FliD	468	48325	4,82	Filamentkappe (HAP2), Flagellinfaltungs-Chaperon
FliE	104	10996	5,15	Basalkörper, Verbindung für MS-Ring und Stab
FliF	552	60589	6,51	Verbindung für Rotorschaltung und Stab, Exportapparat ist darin lokalisiert
FliG	331	36776	4,69	Rotorschaltung, Interaktion mit MS-Ring
FliH	228	25050	4,62	Exportapparat (Cytoplasma), FliI-Regulator
FliI	457	49315	6,37	Exportapparat (Cytoplasma), ATPase
FliJ	147	17306	7,85	Exportapparat (Cytoplasma), Fänger für FlgN und FliT
FliK	375	39311	4,36	Kontrolle der Hakenlänge
FliL	154	17221	9,01	Basalkörper
FliM	334	37849	5,47	C-Ring und Rotorschaltung, Ziel für CheY-P
FliN	137	14855	4,43	C-Ring und Rotorschaltung, Ziel für CheY-P
FliO	101	12670	10,58	Exportapparat (Membran)
FliP	245	26928	8,01	Exportapparat (Membran)
FliQ	89	9632	4,87	Exportapparat (Membran)
FliR	261	28542	5,72	Exportapparat (Membran)
FliS	136	14950	4,64	Chaperon für FliC
FliT	121	13829	4,70	Chaperon für FliD
MotA	295	32011	5,47	Motorrotation, Stator, Antrieb gegen Rotor und Switchkomponenten
MotB	308	34186	9,00	Motorrotation, Stator, Umsetzung von Protonenenergie in Antrieb
Tap	535	57512	5,45	Dipeptidchemorezeptor
Tar	553	59944	5,39	Aspartartchemorezeptor

7.2 ANHANG ZU MATERIAL UND METHODEN

TABELLE 7.2.1: Nukleotidsequenzen und Verwendungszweck der Primer

Nukleotidsequenz des Primers	Verwendungszweck des Primers
5'-AGTGGTCTCCAATGTCCATTGCGGTAACCA CC-3'	Klonierung <i>flgD</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> s
5'-AAAGGTCTCGGCGCTAATTATCTGCCGTAC TTCGTC-3'	Klonierung <i>flgD</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> as
5'-GGTAGGTCTCAAATGGCACAAGTCATTAAT ACCAACAGCC-3'	Klonierung <i>fliC</i> in pASK-IBA 3 <i>BsaI</i> s
5'-GGTAGGTCTCAGCGCTACCCTGCAGCAGAG ACAGAACC-3'	Klonierung <i>fliC</i> in pASK-IBA 3 <i>BsaI</i> as
5'-GCAGGTCTCCAATGTCTGATAATCTGCCGT GG-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> s
5'-GGCGGTCTCTGCGCTCACCCTCCTGGTGC TGCCAG-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> as
5'-GAGTGGTCTCTAATGACCACGCGCCTGACT CGC-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> s
5'-GTAGGTCTCGGCGCTTGACACTGTCGGGA AAATACG-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> as
5'-GATGGTCTCAAATGGCAGAACATGGTGCGC TG-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> s
5'-GCGGGTCTCGGCGCTTTCAGGTTTCCTCAT GGCGGC-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pASK-IBA3 <i>BsaI</i> as
5'-TTAAGCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGT GTGATGGTGATGGTGATG-3'	Klonierung <i>fliI</i> x 12 His in pASK-IBA33 <i>HindIII</i> s
5'-GCATTAGCGGCGGCGGCT-3'	Klonierung <i>fliI</i> x 12 His in pASK-IBA33 <i>BamHI</i> as
5'-GAGTGGTCTCTAATGCAACTGAATTCCACC GAAA-3'	Klonierung <i>uncA</i> in pASK - IBA 33 <i>BsaI</i> s
5'-CCGTTAGGTCTCGGCGCTCCAGGATTGGGT TGCTTT-3'	Klonierung <i>uncA</i> in pASK - IBA 33 <i>BsaI</i> as
5'-AGGAGTGGTCTCTAATGGCTACTGGAAAGA TTGTCC-3'	Klonierung <i>uncD</i> in pASK - IBA 33 <i>BsaI</i> s
5'-CCGTTAGGTCTCGGCGCTAAGTTTTTTGGCT TTTTTC-3'	Klonierung <i>uncD</i> in pASK - IBA 33 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGGCCACCCTGCAGCAGA GACAGAACC-3'	Klonierung <i>fliC</i> in pASK-IBA 45 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGGCCACCCTCCTGGT GCTGCCAG-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pASK-IBA 45 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGGCCTGACACTGTCGGG AAAATACGCT-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pASK-IBA 45 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGGCCTTCAGGTTTCCTC ATGGCGGCG-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pASK-IBA 45 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCATATCAACCCTGCAGCAG AGACAGAACC-3'	Klonierung <i>fliC</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGGCACAAGTC ATTAATACCAACA-3'	Klonierung <i>fliC</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> s
5'-ATGGTAGGTCTCATATCACCACTCCTGG TGCTGCCAG-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGTCTGATAAT CTGCCGTGAAA-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> s
5'-ATGGTAGGTCTCATATCATGACACTGTCGG GAAAATACGCT-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGACCACGCGC CTGACTCGC-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> s

Fortsetzung Tabelle 7.2.1

Nukleotidsequenz des Primers	Verwendungszweck des Primers
5'-ATGGTAGGTCTCATATCATTTCAGGTTTCCTC ATGGCGGCG-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> as
5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGGCAGAACAT GGTGCGCTGG-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pASK-IBA 5 <i>BsaI</i> s
5'-GAGTTATTTTACCACTCC-3'	Sequenzierprimer pASK-IBA s
5'-CGCAGTAGCGGTAAACG-3'	Sequenzierprimer pASK-IBA as
5'-ACGGCGTGAACGTGCTGGCAA-3'	Sequenzierprimer <i>fliC</i> s
5'-ATCAATATCGACCACTTCTGT-3'	Sequenzierprimer <i>fliC</i> as
5'-TGCACTTGATAGTGTGATAGC-3'	Sequenzierprimer <i>fliH</i> s
5'-AGTCTCCGCCGATGAAGGCGA-3'	Sequenzierprimer <i>fliH</i> s
5'-GTTTGATCAGTGCCGAGTTAT-3'	Sequenzierprimer <i>fliH</i> as
5'-ATGCCGCTGGAGGAAGTCGAA-3'	Sequenzierprimer <i>fliI</i> s
5'-CCGCGCGGAGTCGGCAATCGG-3'	Sequenzierprimer <i>fliI</i> as
5'-GCAACACATGCTGACCACGAT-3'	Sequenzierprimer <i>fliI</i> as
5'-AGCCCTTCTGCCGAAATGTTT-3'	Sequenzierprimer <i>fliI</i> as
5'-CTGACATCCGCGACGCATTTTC-3'	Sequenzierprimer <i>fliJ</i> as
5'-ATAAAGGAGAAACATATGTCCATTGCGG TA-3'	Klonierung <i>flgD</i> in pETDuet-1 <i>NdeI</i> s
5'-AAATGTGAACTCGAGAATTATCTGCCGT AC-3'	Klonierung <i>flgD</i> in pETDuet-1 <i>XhoI</i> as
5'-TTTCAGGAGTCACATATGGCCTTTTCTC AA-3'	Klonierung <i>flgE</i> in pETDuet-1 <i>NdeI</i> s
5'-TCCCGTCAGCTCGAGGCGTAAGTTAACC AG-3'	Klonierung <i>flgE</i> in pETDuet-1 <i>XhoI</i> as
5'-GCGGCGAGGAATTCGATGTCTGATAATC TG-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pETDuet-1 <i>EcoRI</i> s
5'-TCAGGCGCGAAGCTTTTACACCACTCCT GG-3'	Klonierung <i>fliH</i> in pETDuet-1 <i>HindIII</i> as
5'-ACCAGGAGGAATTCGATGACCACGCGCC TG-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pETDuet-1 <i>EcoRI</i> s
5'-CCGTTATCTAAGCTTTTATGACACTGTC GG-3'	Klonierung <i>fliI</i> in pETDuet-1 <i>HindIII</i> as
5'-AGGAGATAGAATTCGATGGCAGAACATG GT-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pETDuet-1 <i>EcoRI</i> s
5'-AGGGCGCTAAAGCTTTCATTTCAGGTTTC CT-3'	Klonierung <i>fliJ</i> in pETDuet-1 <i>HindIII</i> as
5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3'	Sequenzierprimer pETDuet-1 MCS 1 as
5'-TTGTACACGGCCGCATAATC-3'	Sequenzierprimer pETDuet-1 MCS 2 s
5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	Sequenzierprimer pETDuet-1 MCS 2 as
5'-GACCCGACCGGATCCATGGAAAACAAC-3'	Klonierung <i>flgD</i> 52-231 in pTS502 <i>phoA</i> <i>BamHI</i> s
5'-GGAGACCGGAATTCCTGGCAC-3'	Klonierung <i>flgDM</i> 52L in pTS502 <i>phoA</i> <i>BamHI</i> s
5'-CTCGTTGTTTTCCAATGGATTGGTCGG-3'	Klonierung <i>flgDM</i> 52L in pTS502 <i>phoA</i> as
5'-CCGACCAATCCATTGGAAAACAACGAG-3'	Klonierung <i>flgDM</i> 52L in pTS502 <i>phoA</i> s
5'-CCCGGTTTTCCAGAACAGGGC-3'	Klonierung <i>flgDM</i> 52L/52-231 in pTS505 <i>phoA</i> <i>NheI</i> as
5'-ATAAGGAAAGGATCCAGGAGTCAGTCA-3'	Klonierung <i>flgE</i> in pTS502 <i>phoA</i> <i>BamHI</i> s
5'-TTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAG-3'	Klonierung <i>flgE</i> in pTS502 <i>phoA</i> <i>NdeI</i> s
5'-GGTGGCGGCGCTAGCTAATCCGCTAAC-3'	Klonierung <i>flgE</i> 1-10 in pTS502 <i>phoA</i> <i>NheI</i> as
5'-GGCGATATTGCTAGCAATAACATCGAG-3'	Klonierung <i>flgE</i> 1-20 in pTS502 <i>phoA</i> <i>NheI</i> as
5'-GGCAACTTTGCTAGCCAGTCCCACTTT-3'	Klonierung <i>flgE</i> 1-50 in pTS502 <i>phoA</i> <i>NheI</i> as
5'-GTTTTCATCGCTAGCAAATTGTCCGTT-3'	Klonierung <i>flgE</i> 1-100 in pTS502 <i>phoA</i> <i>NheI</i> as

Fortsetzung Tabelle 7.2.1

Nukleotidsequenz des Primers	Verwendungszweck des Primers
5'-ATCCCCGGTGCTAGCAAAGTAGACGCT-3'	Klonierung <i>flgE1</i> -200 in pTS <i>flgEphoA</i> <i>NheI</i> as
5'-GTTGGAATAGCTAGCGACAACCGTACC-3'	Klonierung <i>flgE1</i> -300 in pTS <i>flgEphoA</i> <i>NheI</i> as
5'-TCCCGTCAGGCTAGCGCGTAAGTTAAC-3'	Klonierung <i>flgE1</i> -402 in pTS502 <i>phoA</i> <i>NheI</i> as
5'-AACTTAATCGCCTGGCAGCAC-3'	Sequenzierprimer pTS502 <i>phoA</i> s
5'-CCATCCCATCGCCAATCAGCA-3'	Sequenzierprimer pTS502 <i>phoA</i> as
5'-CATTTAAGCTGATGGCAGAATTTTGATACC TGCGGAGGAGATATGCTCGTGTAGGCTGGAG CTGCTTCG-3'	<i>flgB-E</i> -Deletion s
5'-GTATAAATTGCGTGATCCATTGAGCTATCC CGTCAGCGATTAGCGTAAATGAATATCCTCCT TAGT-3'	<i>fliB-E</i> -Deletion as
5'-AATACGTAATCAACGACTTGCAATATAGGA TAACGAATCATGGCACAAGTGTAAGGCTGGAG CTGCT-3'	<i>fliC</i> -Deletion s
5'-TGGCGTTGCCGTCAGTCTCAGTTAATCAGG TTACAACGATTAACCCTGATGAATATCCTCCT TAGT-3'	<i>fliC</i> -Deletion as
5'-CTGATTGTGCGCCGCTTGCCGAACTGGC GAGATGGTAATGGGCAGCGTGTAAGGCTGAGC TGCTT-3'	<i>fliH</i> -Deletion s
5'-CCAGCGTGTTAGCCAGCGAGTCAGGCGCG TGGTCATTACACCACTCCCATATGAATATCCT CCTCCTTAGT-3'	<i>fliH</i> -Deletion as
5'-GCAAGAACTCTGCCGTCTGGCAGCACCAGG CGTGGTGTAATGACCACGGTGTAAGGCTGAGCT GCTT-3'	<i>fliI</i> -Deletion s
5'-CCCCATCGCACCATGTTCTGCCATCTGCCGT TATCTCCTGGGTATGACATATGAATATCCTC CTTAGT-3'	<i>fliI</i> -Deletion as
5'-ATTTTCCCGACAGTGTCATAACCCAGGAGA TAACGGCAGATGGCAGAAGTGTAAGGCTGGAG CTGCTTCG-3'	<i>fliJ</i> -Deletion s
5'-TGTC AACGTCGGCGGTAATCAAGGGCGCTA AGCGAATCATTACAGGTTTCATATGAATATCCT CCTTAGT-3'	<i>fliJ</i> -Deletion as
5'-GATCTTCCGTCACAGGTAGG-3'	Kontrolle Cam ^R (pKD3)-Insertion s
5'-TTATACGCAAGGCGACAAGG-3'	Kontrolle Cam ^R (pKD3)-Insertion as
5'-ATAAGCTGATAACGCCACGCT-3'	Kontrolle MO1 s
5'-GAGCGCTGTATCGACATGCGG-3'	Kontrolle MO1 as
5'-GGCGGATCCGGGCATCGCGGCAACCACA TA-3'	Kontrolle MO2 s
5'-CGCGGATCCTTCTGCACCGTTAATTGCG CC-3'	Kontrolle MO2 as
5'-ATTCAACTGCGCGCGAAAACC-3'	Kontrolle <i>flgB-E</i> -Deletion as
5'-ATTGGCGGTCTGGAAAGTCGT-3'	Kontrolle <i>fliC</i> -Deletion s
5'-AGTGGGTGAAATGAGGGGTTA-3'	Kontrolle <i>fliC</i> -Deletion as
5'-CAATATGTCGACGCGTGCCGC-3'	Kontrolle <i>fliH</i> -Deletion s
5'-TGTAATCCGGTGGCTTCCAGC-3'	Kontrolle <i>fliH</i> -Deletion as
5'-GCGGCGAGGGGATCCATGTCTGATAATC TG-3'	Kontrolle <i>fliI</i> -Deletion as
5'-CAACAACGCGAGAAAATCTTG-3'	Kontrolle <i>fliI</i> / <i>fliJ</i> -Deletion as
5'-GACTCCGCGCGGGCGATCCTC-3'	Kontrolle <i>fliJ</i> -Deletion s

Fortsetzung Tabelle 7.2.1	
Nukleotidsequenz des Primers	Verwendungszweck des Primers
5'-ACACGTCCCGGGGATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'	Klonierung Kan ^R (pKD4) in pUC19 <i>Bam</i> HI s
5'-AATTAGCCAGTCGACATATGAATATCCTCCTTAG-3'	Klonierung Kan ^R (pKD4) in pUC19 <i>Sal</i> I as
5'-TAAATTGAATTCTAGGGATAACAGGGTAATGCGATTGGCGAACCCC-3'	Klonierung 5'- <i>FliJ</i> (A) und I- <i>Sce</i> I in pUC19KanR <i>Eco</i> RI s
5'-CGCACCCCCGGGTGCCATCTGCCG-3'	Klonierung 5'- <i>FliJ</i> (A) in pUC19KanR <i>Xma</i> I as
5'-CGCGCCGCCGTCGACAAACCTGAATGATTC-3'	Klonierung 3'- <i>FliJ</i> (B) in pUC19KanR <i>Sal</i> I s
5'-TGCTGTTGTAAGCTTCTCAGAAGTCAGTTT-3'	Klonierung 3'- <i>FliJ</i> (B) in pUC19KanR <i>Hind</i> III as

7.3 ANHANG ZU DEN ERGEBNISSEN

TABELLE 7.3.1: *E. coli*-Deletionsstämme und deren Herkunft

<i>E. coli</i> -Deletionsstamm	Herkunft
CC181 <i>flgB-E</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>flgB-E</i>	diese Arbeit
CC181 <i>fliC</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>fliC</i>	diese Arbeit
CC181 <i>fliH</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>fliH</i>	diese Arbeit
CC181 <i>fliI</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>fliI</i>	diese Arbeit
CC181 <i>fliJ</i> Kan ^R pACBSR (Cam ^R)	diese Arbeit
CC181 <i>fliJ</i> pACBSR (Cam ^R)	diese Arbeit
CC181 <i>fliHI</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>fliHI</i>	diese Arbeit
CC181 <i>fliIJ</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>fliIJ</i>	diese Arbeit
CC181 <i>fliHIJ</i> Cam ^R	diese Arbeit
CC181 <i>fliHIJ</i>	diese Arbeit
EMG2 <i>fliI</i> Cam ^R	diese Arbeit
EMG2 <i>fliI</i>	diese Arbeit
EMG2 <i>fliJ</i> Kan ^R pACBSR (Cam ^R)	diese Arbeit
EMG2 <i>fliI</i> pACBSR (Cam ^R)	diese Arbeit

TABELLE 7.3.2: Plasmide und deren Herkunft

Plasmid	Herkunft
pASK-IBA 3 <i>flgD</i>	Nadine Albert (Forschungspraktikum 2003)
pASK-IBA 3 <i>fliH</i>	Nadine Albert (Forschungspraktikum 2003)
pASK-IBA 3 <i>fliI</i>	Nadine Albert (Forschungspraktikum 2003)
pASK-IBA 3 <i>fliJ</i>	Nadine Albert (Forschungspraktikum 2003)
pASK-IBA 33 <i>fliC</i>	Alexander Schlüter (Diplomarbeit 2003)

Fortsetzung Tabelle 7.3.2	
Plasmid	Herkunft
pASK-IBA 33 <i>fliH</i>	Alexander Schlüter (Diplomarbeit 2003)
pASK-IBA 33 <i>fliI</i>	Alexander Schlüter (Diplomarbeit 2003)
pASK-IBA 33 <i>fliI</i> 12 x His	diese Arbeit
pASK-IBA 33 <i>fliJ</i>	Alexander Schlüter (Diplomarbeit 2003)
pASK-IBA 33 <i>fliHI</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliHI</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliIJ</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 45 <i>fliHIJ</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 5 <i>fliC</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 5 <i>fliH</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 5 <i>fliI</i>	diese Arbeit
pASK-IBA 5 <i>fliJ</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliH</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliI</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliJ</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliHI</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliIJ</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliHIJ</i>	Carolin Möckel (Forschungspraktikum 2005)
pETDuet-1 <i>flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>flgE</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliH flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliI flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliJ flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliHI flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliIJ flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliHIJ flgD</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliH flgE</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliI flgE</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliJ flgE</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliHI flgE</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliIJ flgE</i>	diese Arbeit
pETDuet-1 <i>fliHIJ flgE</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD52-231 <i>flgDphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SDM52L <i>flgDphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-402 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-10 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-20 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-50 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-100 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-200 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pT7-5 SD1-300 <i>flgEphoA</i>	diese Arbeit
pUC19 Kan ^R	diese Arbeit
pUC19 Kan ^R + A + B	diese Arbeit

TABELLE 7.3.3: Motilität und Genexpression. Die Motilität wurde mit Hilfe von Soft-Trypton-Platten und die Genexpression durch Westernblotanalysen nachgewiesen
 [+ = Motilität/Genexpression vorhanden, ++ = starke Motilität/Genexpression,
 (+) = schwache Motilität/Genexpression, - = keine Motilität/ Genexpression].

Stamm	Plasmid	Induktor	Anti-biotikum	Motilität	Genexpression
BL21 (DE3)				-	
BL21 (DE3)		AHT		-	
BL21 (DE3)		IPTG		-	
BL21 (DE3)	pASK-IBA 3 <i>flgD</i>	AHT	Ampicillin		(+)
BL21 (DE3)	pASK-IBA 3 <i>fliH</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 3 <i>fliI</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 3 <i>fliJ</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 33 <i>fliC</i>	AHT	Ampicillin		(+)
BL21 (DE3)	pASK-IBA 33 <i>fliH</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 33 <i>fliI</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 33 <i>fliI</i> 12 x His	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 33 <i>fliJ</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 33 <i>fliHI</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		-	
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		-	
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	++
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	++
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliHI</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliIJ</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliHIJ</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 5 <i>fliC</i>	AHT	Ampicillin		-
BL21 (DE3)	pASK-IBA 5 <i>fliH</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 5 <i>fliI</i>	AHT	Ampicillin		+
BL21 (DE3)	pASK-IBA 5 <i>fliJ</i>	AHT	Ampicillin		+
C41 (DE3)				-	
C41 (DE3)		AHT		-	
C41 (DE3)		IPTG		-	
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		-	
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		(+)	
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
C41 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	(+)	+
C43 (DE3)				-	
C43 (DE3)		AHT		-	
C43 (DE3)		IPTG		-	

Fortsetzung Tabelle 7.3.3					
Stamm	Plasmid	Induktor	Anti-biotikum	Motilität	Genexpression
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		-	
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		-	
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
C43 (DE3)	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
CC181				++	
CC181		AHT		+	
CC181		IPTG		+	
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		+	
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		+	
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		+	
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		+	
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliIJ</i>	AHT		++	
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	+	-
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	+	+
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	+	(+)
CC181	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	+	(+)
CC181 <i>flgB-E</i>				-	
CC181 <i>fliC</i>				-	
CC181 <i>fliH</i>				-	
CC181 <i>fliI</i>				-	
CC181 <i>fliJ</i>	pACBSR			-	
CC181 <i>fliHI</i>				-	
CC181 <i>fliIJ</i>				-	
CC181 <i>fliHIJ</i>				-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 3	AHT		-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 3 <i>fliH</i>	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 3	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 3 <i>fliI</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 3 pACBSR	AHT		-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 3 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT		+	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 3	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 3 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 3	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 3 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	+	+
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 3 pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 3 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	+	+
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 33	AHT		-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 33 <i>fliH</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliH</i>	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliI</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliJ</i>	AHT		-	

Fortsetzung Tabelle 7.3.3					
Stamm	Plasmid	Induktor	Anti-biotikum	Motilität	Genexpression
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 33 pACBSR	AHT		-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 33 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT		+	
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 33	AHT		-	
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliHI</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 33	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 33 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	+	+
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	+	+
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 33 pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 33 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	+	+
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 33	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 33 <i>fliHI</i>	AHT	Carbenicillin	+	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 45	AHT		-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 pACBSR	AHT		-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT		+	
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 45	AHT		-	
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliHI</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliIJ</i>	pASK-IBA 45	AHT		-	
CC181 <i>fliIJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliIJ</i>	AHT		(+)	
CC181 <i>fliHIJ</i>	pASK-IBA 45	AHT		-	
CC181 <i>fliHIJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliHIJ</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 45	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	+	(+)
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 45	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliHI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliHI</i>	AHT	Carbenicillin	+	
CC181 <i>fliIJ</i>	pASK-IBA 45	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliIJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliIJ</i>	AHT	Carbenicillin	(+)	
CC181 <i>fliHIJ</i>	pASK-IBA 45	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliHIJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliHIJ</i>	AHT	Carbenicillin	+	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 5	AHT		-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 5 <i>fliH</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 5	AHT		-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 5 <i>fliI</i>	AHT		+	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 5 pACBSR	AHT		-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 5 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT		+	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 5	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliH</i>	pASK-IBA 5 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	+	

Fortsetzung Tabelle 7.3.3					
Stamm	Plasmid	Induktor	Anti-biotikum	Motilität	Genexpression
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 5	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliI</i>	pASK-IBA 5 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	+	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 5 pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	
CC181 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 5 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	+	
EMG2				++	
EMG2		AHT		+	
EMG2		IPTG		+	
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		+	
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		-	
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	+	-
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2 <i>fliI</i>				-	
EMG2 <i>fliI</i>		AHT		-	
EMG2 <i>fliI</i>		IPTG		-	
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		-	
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		-	
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2 <i>fliI</i>	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2 <i>fliJ</i>	pACBSR			-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pACBSR	AHT		-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pACBSR	IPTG		-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliC</i> pACBSR	AHT		-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliH</i> pACBSR	AHT		-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliI</i> pACBSR	AHT		-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT		-	
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliC</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliH</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	(+)
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliI</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	-
EMG2 <i>fliJ</i>	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i> pACBSR	AHT	Carbenicillin	-	-
DH5α				+	
DH5α		AHT		+	
DH5α		IPTG		+	
DH5α	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		++	
DH5α	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		+	
DH5α	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		+	
DH5α	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		+	
DH5α	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	+	(+)
DH5α	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	+	(+)

Fortsetzung Tabelle 7.3.3					
Stamm	Plasmid	Induktor	Anti-biotikum	Motilität	Genexpression
DH5 α	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	+	+
DH5 α	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	+	+
MO1				-	
MO1		AHT		-	
MO1		IPTG		-	
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		-	
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		-	
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
MO1	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
MO2				-	
MO2		AHT		-	
MO2		IPTG		-	
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT		-	
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT		-	
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT		-	
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT		-	
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliC</i>	AHT	Carbenicillin	-	-
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliH</i>	AHT	Carbenicillin	-	+
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliI</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
MO2	pASK-IBA 45 <i>fliJ</i>	AHT	Carbenicillin	-	(+)
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliH</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliI</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fli</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliHI</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliIJ</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliHIJ</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>flgE</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliH flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliI flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliJ flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliHI flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliIJ flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliHIJ flgD</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliH flgE</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliI flgE</i>	IPTG	Ampicillin		-
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliJ flgE</i>	IPTG	Ampicillin		(+)
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliHI flgE</i>	IPTG	Ampicillin		+
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliIJ flgE</i>	IPTG	Ampicillin		-
BL21 (DE3) pLysS	pETDuet-1 <i>fliHIJ flgE</i>	IPTG	Ampicillin		+
MO2	pT7-5 SD52-231 <i>flgDphoA</i>	IPTG	Ampicillin		+
MO2	pT7-5 SDM52L <i>flgDphoA</i>	IPTG	Ampicillin		+

Fortsetzung Tabelle 7.3.3					
Stamm	Plasmid	Induktor	Antibiotikum	Motilität	Genexpression
MO2	pT7-5 SD1-402 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO2	pT7-5 SD1-10 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO2	pT7-5 SD1-20 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO2	pT7-5 SD1-50 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO2	pT7-5 SD1-100 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO1	pT7-5 SD1-402 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO1	pT7-5 SD1-10 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO1	pT7-5 SD1-20 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO1	pT7-5 SD1-50 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
MO1	pT7-5 SD1-100 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
CC181 <i>flgB-E</i>	pT7-5 SD1-402 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
CC181 <i>flgB-E</i>	pT7-5 SD1-10 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
CC181 <i>flgB-E</i>	pT7-5 SD1-20 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
CC181 <i>flgB-E</i>	pT7-5 SD1-50 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-
CC181 <i>flgB-E</i>	pT7-5 SD1-100 <i>flgEphoA</i>	IPTG	Ampicillin		-

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Heinrich Jung für das interessante Thema und die Betreuung während meiner Promotion in seiner Arbeitsgruppe.

Bei den mikrobiologischen Abteilungen der Universität Osnabrück und der Ludwig-Maximilians-Universität München, insbesondere bei den Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen Jung, möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern und Schwestern sage ich Danke für die Unterstützung aus der Ferne.

VERÖFFENTLICHUNG

Ein Teil der Ergebnisse dieser Dissertation wurde bereits vorab publiziert in:

Weber-Sparenberg, C.; Pöplau, P.; Brookmann, H.; Rochón, M.; Möckel, C.; Nietschke, M.; Jung, H. (2006): Characterization of the Type III Export Signal of the Flagellar Hook Scaffolding Protein FlgD of *Escherichia coli*, ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, **186**: 307-316

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Die vorliegende Dissertation habe ich selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

ERKLÄRUNGEN

Die Dissertation wurde von Prof. Dr. Heinrich Jung betreut. Ich habe zuvor noch nicht versucht, die Dissertation bei einer anderen Fakultät oder Universität einzureichen oder mich anderweitig einer Doktorprüfung zu unterziehen. Zudem wurde die Dissertation weder als Ganzes noch in Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

LEBENS LAUF

Name:	Petra Pöplau
Geburtstag:	06.09.1968
Geburtsort:	Bremerhaven
1975 – 1979	Grundschule, Axstedt
1979 – 1981	Orientierungsstufe, Hambergen
1981 – 1988	Gymnasium, Osterholz-Scharmbeck Abschluss: Abitur
1988 – 1991	Berufsausbildung zur Kauffrau im Groß- und Außenhandel, Bremen
1991 – 1997	Kaufmännische Angestellte, Bremen
1997 – 2003	Studium: Biologie Universität Bremen Abschluss: Diplom
2003 – 2007	Promotion: Mikrobiologie Universität Osnabrück Ludwig-Maximilians-Universität München